

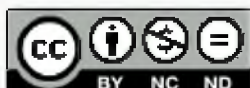
**Aguirre, Gabriela Edith**

**Evaluación de la actividad  
antibacteriana de bacteriocinas  
producidas por bacterias ácido  
lácticas, frente a cepas de  
Staphylococcus aureus  
causantes de mastitis bovina**

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

**Director: Litterio, Nicolás Javier**

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5



# **Universidad Católica de Córdoba**

Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias

## **Evaluación de la actividad antibacteriana de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina**

Gabriela Edith Aguirre

Córdoba, 2017

---

---



## RESUMEN

---

Prácticas inapropiadas en el control de las infecciones, como lo es el uso indiscriminado de antimicrobianos (ATMs), conducen al desarrollo de cepas resistentes. Los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces, incrementando el riesgo de propagación y duración de la enfermedad. La resistencia se ha convertido en una amenaza apremiante para la salud pública y animal en el mundo actual. En busca de alternativas se planteó como objetivo de esta tesis, cuantificar la actividad antibacteriana *in vitro* de las bacteriocinas procedentes de bacterias ácido lácticas (BAL), frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina. De vacas en lactancia del departamento Río Segundo, se tomaron 390 muestras de leche. La prevalencia de mastitis causada por *S. aureus* fue del 11,8%. A partir de cultivos de BAL (2 de *Lactobacillus brevis*, 1 de *Lactobacillus rhamnosus* y 1 de *Enterococcus faecium*) tratados por adsorción-desorción, diálisis, liofilización y electroforesis SDS PAGE, se recuperaron 4 péptidos antimicrobianos (PAs). Sus actividades antimicrobianas frente a *S. aureus* se valoraron por técnica de difusión en agar. Por espectrometría de masas se identificaron como bacteriocina *rhamnosin A* (PA1); proteína de inmunidad a bacteriocina Brevicin 174A (PA2); proteína asociada a bacteriocina de *E. faecium* (PA3) y ABC transportador de escisión / exportación de bacteriocina de *L. brevis* (PA4). PA1 y PA2 fueron los de menor (36,96%) y mayor (43,48%) porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano, respectivamente. Las CIM<sub>90</sub> de oxitetraciclina y tilosina se mantuvieron inferiores a los puntos de cortes clínicos y epidemiológicos (CLSI, 2013; EUCAST, 2015). En el caso de la penicilina se evidenció una resistencia del 45,83% y 33,33% según los puntos de corte clínicos de EUCAST y CLSI,

respectivamente. La CIM<sub>90</sub> de la gentamicina fue inferior al punto de corte clínico de CLSI, pero superior al de EUCAST (12,5% de resistencia). La CIM<sub>90</sub> de la cloxacilina fue inferior al punto de corte clínicos de CLSI. Penicilina, ampicilina y cloxacilina expresaron sensibilidad acotada con CIM<sub>90</sub> superiores al punto de corte epidemiológico (EUCAST). Las CIM<sub>35</sub> de los cuatro PAs fueron superiores a las CIM<sub>35</sub>, CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de los ATMs. Excepcionalmente, las CIM<sub>35</sub> de los PA2 y PA3 fueron inferiores a las CIM<sub>90</sub> de gentamicina, ampicilina y penicilina, y la del PA4 inferior a la de ampicilina y penicilina. Futuras experimentaciones serán necesarias para lograr una identidad más precisa. Comprender las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los PAs resulta esencial para el diseño y desarrollo de alternativas terapéuticas antimicrobianas.

## **PALABRAS CLAVES**

Mastitis bovina - *Staphylococcus aureus*- Péptidos antimicrobianos- Bacteriocinas -  
Concentración inhibitoria mínima- Antimicrobianos -

## SUMMARY

---

Inappropriate practices in the control of infections, such as the indiscriminate use of antimicrobials (ATMs), lead to the development of resistant strains. Conventional treatments become ineffective, increasing the risk of disease spread and duration. Resistance has become a pressing threat to public and animal health in today's world. In search of alternatives, the objective of this thesis was to quantify the *in vitro* antibacterial activity of bacteriocins from lactic acid bacteria (BAL), against strains of *Staphylococcus aureus* that cause bovine mastitis. Of the cows in lactation of the Río Segundo departament, 390 milk samples were taken. The prevalence of mastitis caused by *S. aureus* was 11.8%. From cultures BAL (2 of *Lactobacillus brevis*, 1 of *Lactobacillus rhamnosus* and 1 of *Enterococcus faecium*) treated by adsorption-desorption, dialysis, lyophilization and SDS PAGE electrophoresis, four antimicrobial peptides (APs) were recovered. It's antimicrobial activities against *S. aureus* were evaluated by agar diffusion technique. Mass spectrometry identified as bacteriocin *rhamnosin A* (PA1); bacteriocin immunity protein brevicin 174A (PA2); *E. faecium* bacteriocin-associated protein (PA3) and ABC excision / export carrier of *L. brevis* bacteriocin (PA4). PA1 and PA2 were the lowest (36.96%) and highest (43.48%) percentage inhibition of microbial growth, respectively. Oxytetracycline and tylosin CIM<sub>90</sub> were lower than the clinical and epidemiological cutoff points (CLSI, 2013, EUCAST, 2015). Penicillin revealed a resistance of 45.83% and 33.33% according to the clinical cut points of EUCAST and CLSI, respectively. Gentamicin CIM<sub>90</sub> was lower than the CLSI clinical cut point, but higher than EUCAST (12.5% resistance). The CIM<sub>90</sub> of

cloxacillin was lower than the CLSI clinical cut point. Penicillin, ampicillin and cloxacillin expressed with sensitivity bounded with MIC<sub>90</sub> superior to the epidemiological cut-off point (EUCAST). The MICs of the four PAs were superior to the ATMs of the MIC<sub>35</sub>, CIM<sub>50</sub> and CIM<sub>90</sub>. Exceptionally, the MICs of PA2 and PA3 were lower than the MICs of gentamicin, ampicillin and penicillin, and that of PA4 lower than that of ampicillin and penicillin. Future experiments needed to achieve a more precise identity. Understanding the relationships between the structure and activity of PAs is essential for the design and development of antimicrobial therapeutic alternatives.

#### **KEY WORDS**

Bovine mastitis - *Staphylococcus aureus* - Antimicrobial peptides - Bacteriocins - Minimum inhibitory concentration - Antimicrobial

**Evaluación de la actividad antibacteriana de bacteriocinas  
producidas por bacterias ácido lácticas, frente a cepas de  
*Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina**

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

2017

**Director:** Dr. Nicolás Javier Litterio

**Co-director:** Dr. Laureano Frizzo

**Tribunal de seguimiento:**

Dr. Eduardo J. Picco

Dra. Marcela Rebuelto

Dr. Marcelo Signorini

**Tribunal evaluador:**

Dra. Marcela Rebuelto

Dr. Marcelo Signorini

Dr. Juan Pablo Vico





A Augusto, Juan Cruz y David,  
mis verdaderos motivos de vivir  
y a Julio, mi compañero incondicional,  
por tanta paciencia y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Católica de Córdoba por haberme permitido obtener mi título de Posgrado.

A la Universidad Nacional de Villa María por concederme la posibilidad de desarrollar el trabajo de Tesis.

Al Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas de la UNVM y en especial a la Carrera de Medicina Veterinaria por su contribución e incentivo a la formación de posgrado.

Al Dr. Juan Carlos Boggio que confió en mí y me inició en este camino. Al Dr. Nicolás Litterio por su permanente guía, predisposición y contención, brindándome sus conocimientos y experiencia. Al Dr. Laureano Frizzo que a la distancia supo darme herramientas indispensables en este proceso.

Al Dr. Eduardo J. Picco, a la Dra. Marcela Rebuelto, al Dr. Marcelo Signorini y al Dr. Juan Pablo Vico por haber aceptado ser parte de los tribunales de seguimiento y evaluación de esta Tesis, lo cual es un orgullo para mí.

A la Ing. Adriana Barraza y Mgter Mariana Fernandez Taranco, primero por haber creído y luego por su estímulo y apoyo constante.

A mis compañeros de trabajo que a diario están presentes con su colaboración profesional y calidez humana.

A la Dra. Mariana Bollo, el Dr. Cesar Bonetto, la Dra. Carina Porporatto, la Mgter Gabriela Cabrera, la Dra. Verónica Felipe, el Bioquímico Gerardo Menichetti, la Dra. Mariana Caccia, el Med. Veterinario Alejandro Boatti y la Profesora Sandra Pavón, cuyos aportes fueron claves en distintas etapas de este trabajo.

A todos los alumnos de la Carrera de Medicina Veterinaria de la UNVM que estuvieron siempre prestos para colaborar generosamente y con los que viví gratificantes momentos.

A mis amigos y compañeros que me alentaron en esta empresa.

A mi familia siempre acompañándome.

Plenamente agradecida.

## INDICE GENERAL

---

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Formulación y fundamentación del problema a investigar .....	1
I.2. Hipótesis de trabajo .....	5
I.3. Objetivos.....	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
II.1. Panorama global y regional de la producción láctea.....	6
II.2. Mastitis bovina .....	8
II.2.1. Agentes etiológicos de mastitis bovina .....	12
II.2.2. Mastitis bovina causada por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
II.3. Terapéutica antimicrobiana.....	17
II.3.1. Terapéutica antimicrobiana en mastitis bovina. ....	20
II.3.2. Resistencia bacteriana hacia los antimicrobianos.....	23
II.4. Probióticos.....	28
II.4.1. Bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas.....	29
II.4.2. Aplicaciones de BAL o sus metabolitos liberados .....	32
II.4.3. Diseño de probióticos para uso en bovinos .....	33
II.5. Péptidos antimicrobianos .....	34

II.5.1. Bacteriocinas .....	35
II.5.2. Clasificación de las bacteriocinas.....	37
II.5.3. Mecanismos de acción de las bacteriocinas .....	38
II.5.4. Resistencia de las bacteriocinas.....	40
II.5.5. Avances y aplicaciones en la industria de la alimentación.....	41
II.5.6. Potencialidades farmacológicas de las bacteriocinas .....	42
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
III.1. Mastitis bovina en el Departamento Río Segundo (Córdoba) .....	44
III.1.1. Animales intervinientes en el muestreo .....	44
III.1.2. Caracterización de los establecimientos.....	45
III.1.3. Examen clínico de la glándula mamaria y toma de muestras de leche .....	47
III.1.4. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y recuento de células somáticas .....	49
III.1.5. Estimación de la prevalencia de mastitis.....	50
III.1.6. Análisis de los factores de riesgo asociados a la presencia de mastitis.....	51
III.2. Péptidos antimicrobianos .....	52
III.2.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas y elaboración de los extractos libres de células.....	52
III.2.2. Valoración de la actividad antibacteriana de las sustancias inhibitorias presentes en los extractos libres de células.....	53
III.2.3. Caracterización de las sustancias inhibitorias: tratamiento con proteinasa K y valoración de la termoestabilidad a distintos pH .....	54

III.2.4. Purificación de los péptidos antimicrobianos.....	55
III.2.5. Electroforesis.....	56
III.2.6. Secuenciación de aminoácidos.....	58
III.2.7. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias de las bacterias ácido lácticas productoras de los péptidos antimicrobianos .....	59
III.3. Perfiles de susceptibilidad / resistencia de antibióticos y péptidos antimicrobianos .....	60
III.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos .....	60
III.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los péptidos antimicrobianos .....	61
III.3.3. Análisis de las concentraciones inhibitorias mínimas de antibióticos y péptidos antimicrobianos .....	62
CAPÍTULO IV. RESULTADOS .....	63
IV.1. Mastitis bovina en el Departamento Río Segundo (Córdoba) .....	63
IV.1.1. Animales y tambos intervinientes en el muestreo.....	63
IV.1.2. Análisis descriptivo y prevalencia de mastitis. ....	64
IV.1.3. Análisis de la asociación entre los factores de riesgo hipotéticos y la presencia de mastitis por <i>S. aureus</i> .....	68
IV.2. Resultados relacionados a los péptidos antimicrobianos .....	71
IV.2.1. Aislamientos de bacterias ácido lácticas y determinación de la actividad antibacteriana de las sustancias inhibitorias presentes en los extractos libres de célula .....	71
IV.2.2. Respuesta al tratamiento con proteinasa K y termoestabilidad a distintos pH .....	72
IV.2.3. Purificación, concentración y electroforesis de los péptidos antimicrobianos .....	74

IV.2.4. Identificación de los péptidos antimicrobianos .....	75
IV.2.5. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias de bacterias ácido lácticas .....	77
IV.3. Distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas frente a <i>S. aureus</i> .....	77
IV.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los ATMs frente a <i>S. aureus</i> aislados en leche .....	77
IV.3.2. Estimación de las concentraciones de los péptidos antimicrobianos .....	83
IV.3.3. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de los péptidos antimicrobianos frente a <i>S. aureus</i> aislados en leche .....	84
IV.3.4. Comparación de las concentraciones inhibitorias mínimas y de las frecuencias relativas acumuladas de los péptidos inhibitorios respecto de los ATMs .....	86
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN .....	89
V.1. Diseño de la toma de muestra .....	89
V.2. Infecciones intramamarias causadas por <i>S. aureus</i> a nivel departamental .....	89
V.3. Categorización de los tambos e incidencia de cada categoría en la prevalencia regional $\alpha$ <i>S. aureus</i> . Análisis estadístico de los factores de exposición (riesgo) asociados a mastitis en el departamento y en cada categoría .....	91
V.4. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de <i>S. aureus</i> regionales frente a los ATMs convencionales .....	95
V.5. Bacterias ácido lácticas y péptidos antimicrobianos. Susceptibilidad de los <i>S. aureus</i> regionales frente a los péptidos antimicrobianos en comparación con los antimicrobianos ...	100
CAPITULO VI. CONCLUSIONES .....	106
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110

CAPÍTULO VIII. ANEXOS .....	136
VIII.1. Selección de la población objeto de análisis para la estimación de mastitis bovina en el departamento Río Segundo, Córdoba (SENASA / EDeSA, 2012).....	136
VIII.2. Localidades del departamento Río Segundo desde donde se obtuvieron las muestras de leche .....	136
VIII.3. ANOVA para la producción láctea (l/día/animal). Diferencias entre las categorías de tambos valorados mediante Test de Tukey ( $p < 0,05$ ) .....	138
VIII.4. Recuento de las células somáticas de las muestras de leche .....	138
VIII.5. Medida de los halos de los extractos libres de células de bacterias ácido lácticas, neutralizados y sin neutralizar .....	139
VIII.6. Prueba de inhibición del crecimiento antimicrobiano de los sobrenadantes resultados de la aplicación del método de adsorción-desorción y de los primeros sobrenadantes descartados del proceso .....	139
VIII.7. Geles de las electroforesis utilizados para el cálculo de la concentración proteica de los péptidos antimicrobianos a través del programa ImageJ .....	140
VIII.8. Resultado de las alineaciones de los péptidos antimicrobianos con péptidos reportados en la base de datos del National Center for Biotechnology Information .....	141
VIII.9. Identificaciones genotípicas de las bacterias ácido lácticas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information .....	143
VIII.10. Diluciones de ATMs y péptidos antimicrobianos empleadas para las determinaciones de las concentraciones inhibitorias mínimas .....	153
VIII.11. Cepas inhibidas de <i>S. aureus</i> a distintas diluciones de los péptidos antimicrobianos .....	154



VIII.12. Frecuencias relativas acumuladas de las cepas inhibidas ante los ATMs y los péptidos antimicrobianos a las distintas diluciones .....	156
--	-----

## INDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Distribución de las principales cuencas lecheras en Argentina. ....	7
Figura 2. Patogenia de la mastitis bovina. ....	9
Figura 3. Ubre característica con mastitis clínica.....	11
Figura 4. Invasión del tejido mamario por <i>S. aureus</i> .....	14
Figura 5. Triángulo terapéutico de los principios de la terapia antimicrobiana. ....	18
Figura 6. Puntos de corte epidemiológico (CUT-OFF) para cloxacilina frente a <i>S. aureus</i> según EUCAST (2016). ....	20
Figura 7. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración de prevención mutante (CPM). ....	25
Figura 8. Incremento de la resistencia de <i>Stahylococcus aureus</i> . ....	27
Figura 9. Inhibición del crecimiento bacteriano de extractos crudos de bacterias ácido lácticas (BAL).....	31
Figura 10. Estructura de la Nisina. ....	36
Figura 11. Proceso de aislamiento de las cepas de <i>S. aureus</i> . ....	49
Figura 12. Cultivo de bacterias ácido lácticas típicas.....	52
Figura 13. Longitud considerada en la medida de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.....	54
Figura 14. Esquema de corrida de electroforesis SDS-PAGE.....	57
Figura 15. Distribución de los tambos seleccionados para el muestreo del departamento Río Segundo, Córdoba. ....	63

Figura 16. Producción diaria de leche por animal, para las diferentes categorías de tambos, intervalo de confianza del 95 %. Existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la producción entre cada categoría de tambos. ....	64
Figura 17. Prevalencia de mastitis en las vacas en lactancia radicadas en el departamento de Río Segundo, de acuerdo a los parámetros clínicos, la presencia en leche de <i>S. aureus</i> y RCS $\geq$ 200.000 cél/ml. ....	65
Figura 18. Prueba de difusión en agar para uno de los ELCN tratados con proteinasa K, para valorar el carácter peptídico de la sustancia inhibitoria presente en el mismo. Se puede observar la presencia de halo de inhibición en el control negativo y la ausencia del mismo cuando el ELCN fue tratado con proteinasa K. ....	72
Figura 19. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 59.....	73
Figura 20. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 81.....	73
Figura 21. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 90.....	74
Figura 22. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 108.....	74
Figura 23. Resolución de los geles por electroforesis y actividad antibacteriana. ....	75
Figura 24. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por oxitetraciclina.....	80
Figura 25. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por cloxaciclina. ....	80
Figura 26. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por gentamicina.....	80
Figura 27. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por tilosina.....	81
Figura 28. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por ampicilina.....	81
Figura 29. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por penicilina.....	81
Figura 30. Densidades relativas de cada péptido antimicrobiano en función de concentraciones conocidas de albúmina, obtenidas por la utilización del programa ImageJ. ....	83
Figura 31. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por el péptido 59.....	85

Figura 32. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por el péptido 81.....	85
Figura 33. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por el péptido 90.....	86
Figura 34. Distribución del porcentaje de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos por el péptido 108.....	86
Figura 35. Cepas de <i>S. aureus</i> (n=46) inhibidos (FRA %) en las distintas concentraciones. ....	88

## INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Determinantes de patogenicidad de <i>S. aureus</i> .....	16
Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su capacidad de distribución en la ubre luego de su administración extramamaria.....	22
Tabla 3. ATMs de uso intramamario.....	22
Tabla 4. Ejemplos de cepas probióticas más comúnmente utilizadas en productos alimenticios.	30
Tabla 5. Datos considerados en la encuesta semiestructurada para la caracterización de los tambos.....	46
Tabla 6. Interpretación de resultados para la estimación de la prevalencia de mastitis, tras la exploración clínica de la glándula mamaria bovina, la bacteriología de la leche (ausencia o presencia de <i>S. aureus</i> ) y el recuento de células somáticas (RCS) en la leche. ....	50
Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR.....	59
Tabla 8. Prevalencia de infección intramamaria (IIM) por <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	66
Tabla 9. Proporción de tambos que poseen los factores de la encuesta planteados como predisponentes para la adquisición y/o persistencia de mastitis por <i>S. aureus</i> .....	67
Tabla 10. Razón de prevalencias y prevalencia atribuible en el grupo expuesto. ....	68
Tabla 11. Factores de riesgo asociados con la presentación de IIM por <i>S. aureus</i> . Cantidad de casos (%), <i>Odds ratio</i> , $p < 0,05$ . ....	69
Tabla 12. Variables sometidas a un modelo mixto lineal generalizado que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ). ....	71

Tabla 13. Estadística descriptiva de la medida de los halos de inhibición microbiana de los extractos libres de células “sin neutralizar” y “neutralizados” .....	72
Tabla 14. Prueba T (muestras apareadas) aplicada a cada par de extracto libre de célula “sin neutralizar” y “neutralizados”. .....	72
Tabla 15. Resultados de las alineaciones entre las secuencias de cada péptido antimicrobiano en estudio con las secuencias de la base de datos NCBI .....	76
Tabla 16. Número de cepas de <i>S. aureus</i> (n=46) que resultaron inhibidas (valores absolutos y porcentuales) frente a diferentes ATMs, tras la prueba cuantitativa de dilución en agar. Confrontación con los puntos de corte clínicos de CLSI (2013) y EUCAST (2015). .....	78
Tabla 17. Número de cepas de <i>S. aureus</i> (n=46) que resultaron inhibidas (valores absolutos y porcentuales) frente a diferentes ATMs, tras la prueba cuantitativa de dilución en agar. Confrontación con los puntos de corte epidemiológicos-ecoff EUCAST (2015). .....	79
Tabla 18. Concentración de cada péptido antimicrobiano en los 25 µl de siembra, por ml (1.000 µl) y en la solución inicial para las diluciones utilizadas en el cálculo de las CIM. ....	84
Tabla 19. Número de cepas de <i>S. aureus</i> (n=46) que resultaron inhibidas frente a los péptidos antimicrobianos, tras la prueba cuantitativa de dilución en agar. ....	84
Tabla 20. CIM <sub>35</sub> , CIM <sub>50</sub> y CIM <sub>90</sub> de ATMs y los PAs. ....	87

## UNIDADES DE MEDIDA UTILIZADAS EN EL TEXTO

---

g	Gramo
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
kDa	Kilo Dalton
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
min	Minuto
h	Hora
°C	Grados centígrados
Cél/ml	Células / mililitro
UFC/ml	Unidad formadora de colonias / mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
% p/v	Porcentaje peso / volumen
% v/v	Porcentaje volumen / volumen
V	Volt
xg	Gravedad, en procesos de centrifugación

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

---

### I.1. Formulación y fundamentación del problema a investigar

La producción lechera global se concreta en una diversidad de formas y condiciones, respondiendo al contexto socio-económico en que se suceda (FAO, 2016). Argentina se presenta como el segundo país productor de leche de Latinoamérica, ocupando el décimo primer lugar a nivel mundial (Sánchez *et al.*, 2012). La obtención primaria de leche se produce principalmente en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y en menor medida en Entre Ríos, La Pampa, Tucumán y Santiago del Estero. La producción total de Córdoba se distribuye en sus tres cuencas lecheras: Noreste (contiene el departamento Río Segundo), Villa María y la cuenca Sur (INTA, 2011; Dirección General de Estadísticas y Censos, de la provincia de Córdoba, 2015). La importancia que conlleva este sector productivo, hace que sea determinante la generación de estrategias dirigidas a lograr una mejor calidad de la leche garantizando un producto confiable y sano que cumpla con los requisitos de aceptación del cliente, teniendo como eje la salud de la ubre (Gianneechini *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2016; Oliszewski, 2016).

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria que a menudo resulta de la infección bacteriana. Es una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas ocasiona, ya que impacta en la cantidad y calidad de la leche producida, constituyendo un importante problema sanitario en la ganadería lechera y en la industria láctea mundial (Bouchard *et al.*, 2015; Asli *et al.*, 2017). Puede presentarse en forma subclínica, en la cual no se perciben signos compatibles con un proceso inflamatorio en la ubre, ni cambios visibles en la leche; o en forma clínica que se caracteriza por anormalidades visibles tanto en la ubre como en la leche. En ambos casos se observa una disminución de la producción y la calidad de la leche (Fernández Bolaños *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Gianneechini *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2014).

La mastitis puede ser causada por más de 140 microorganismos diferentes, entre los que se incluyen patógenos contagiosos, bacterias del medio ambiente, bacterias oportunistas y otros organismos (Fernández Bolaños *et al.*, 2012). En Argentina los microorganismos más prevalentes en mastitis subclínica son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp*, mientras que en mastitis



clínica son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulasa negativo (CNS), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y coliformes (Martínez Pacheco *et al.*, 2013). *S. aureus* es el agente etiológico más prevalente tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero pudiendo ser un contaminante tanto de la leche como de sus derivados (Pereyra *et al.*, 2014). Debido a la fácil transmisión de *S. aureus* en el rodeo durante las prácticas de ordeño, la mastitis es un problema persistente. Además es contagiosa y su tratamiento suele ser problemático, debido a la aparición de cepas productoras de enzima betalactamasa que las torna resistentes a agentes antimicrobianos (ATMs) (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2013; Asli *et al.*, 2017; Hamid *et al.*, 2017).

La terapia antibiótica es un componente necesario dentro de los programas de control de mastitis. Tanto en la prevención como el tratamiento el principal objetivo es eliminar al organismo invasor mediante la aplicación de ATMs (Giannechini *et al.*, 2014; Pyörälä, 2016).

El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST) y el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio estadounidense (*Clinical Laboratory Standards Institute*; CLSI) han publicado procedimientos de referencia para conocer la sensibilidad a los ATMs, métodos que se revisan y actualizan periódicamente (Esparza *et al.*, 2014). El objetivo es establecer puntos de corte clínicos, que permitan identificar poblaciones bacterianas sensibles, intermedias o resistentes; y punto de corte epidemiológicos con el fin de evaluar la evolución de las poblaciones bacterianas que van adquiriendo mecanismos de resistencia. Los procedimientos de EUCAST y CLSI para definir puntos de corte se fundamentan en el análisis de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) bacterianas (definidas como la menor concentración del fármaco que previene el crecimiento de un patógeno específico, detectado a simple vista), así como en la aplicación de diferentes variables farmacocinéticas y farmacodinámicas, que permiten relacionar los resultados del antibiograma con la respuesta clínica a un determinado ATM (Canut & Martínez-Martínez, 2014).

La aplicación de terapia antibiótica para controlar la mastitis ha sido muy eficaz, pero lamentablemente el uso desmedido de ATMs a nivel global, tanto en veterinaria como en salud pública ha traído aparejado el desarrollo de cepas bacterianas resistentes, considerándose por tanto éste fenómeno un tema prioritario de investigación y de desarrollo de prácticas de buen uso, por entidades de referencia como lo son la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015). Uno de los principales problemas para el

control de la mastitis producida por *S. aureus* se relaciona con diferentes niveles de resistencia a los ATMs, particularmente a los betalactámicos (Cervantes-García, *et al.*, 2014; López-Vázquez *et al.*, 2015; Hamid *et al.*, 2017).

Los péptidos antimicrobianos (PAs) surgen de la necesidad de búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que permitan sustituir a los ATMs convencionales, siendo particularmente atractivos por su pequeño tamaño, rápida acción y pocas posibilidades de desarrollar resistencia (Tonarelli & Simonetta, 2014; Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016). Se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal, y tienen la capacidad de destruir diferentes bacterias, hongos, parásitos y células cancerosas. Dentro de los PAs producidos por bacterias han cobrado gran interés las bacteriocinas (Tonarelli & Simonetta, 2014; Starr, *et al.*, 2017).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, que pueden ser aisladas a partir de alimentos fermentados, masas ácidas, bebidas, plantas, leche y los tractos respiratorio, intestinal y vaginal de animales de sangre caliente, entre otros (Zapata *et al.*, 2009). Debido a sus propiedades probióticas y a que son parte de la microbiota normal de las mucosas, se les atribuye bajo potencial patogénico, siendo consideradas organismos GRAS (*General Regarded As Safe*) y utilizadas ampliamente en la preservación de alimentos (Sánchez & Tromps, 2014; Laulund *et al.*, 2017). Despierta interés la producción de metabolitos como el peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido cítrico, bacteriocinas, entre otros, ya que causan la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Fernández Villa *et al.*, 2014).

Las BAL secretan bacteriocinas, pequeños péptidos bioactivos, simples o complejos, de síntesis ribosomal, que ejercen su acción de modo extracelular y poseen actividad antimicrobiana como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismos (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2014; Londoño *et al.*, 2015). Actualmente, las bacteriocinas son utilizadas como preservantes naturales en una amplia categoría de alimentos, incluyendo cárnicos, lácteos, productos enlatados, vegetales y bebidas como cerveza y vino. Sus características de compatibilidad en dichos productos, así como su modo de acción, hacen atractivo su uso. También la búsqueda de alternativas al uso de ATMs, ha suscitado la exploración de las capacidades de las bacteriocinas. Estas cuentan con un espectro de actividad que cubre bacterias, hongos y virus. Poseen un objetivo relativamente no específico o múltiples objetivos. Generalmente para producir resistencia se requieren múltiples pasos sub CIM o de la presencia de proteasas específicas; aun así la resistencia que ejercen es inferior a la que producen los ATMs convencionales. Incluyen mecanismos anti-endotóxicos y de incremento en la

respuesta inmune innata. Poseen una vida media corta por degradación proteolítica; no se conocen toxicidades por su uso tópico y son agentes inmunomoduladores (Monteagudo-Mera, *et al.*, 2011; Fernández Villa *et al.*, 2014). En los últimos años se llevaron adelante numerosas investigaciones en función de las características mencionadas (Tonarelli & Simonetta, 2014; Álvarez-Calatayud *et al.*, 2015; Rodrigues De Oliveira *et al.*, 2015; Jurado-Gámez *et al.*, 2015; Prieto Peña *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2015; Starr, *et al.*, 2017).

Río Segundo es un departamento de la Provincia de Córdoba carente de datos históricos en lo que a mastitis bovina se refiere, por lo cual se propuso estimar la prevalencia de la afección mamaria por *S. aureus*. Además se consideró de interés analizar los perfiles de sensibilidad / resistencia para ATMs de uso frecuente en la región frente a estas cepas de *S. aureus*. En la búsqueda de alternativas a los tratamientos antimicrobianos convencionales que contribuyan a la disminución de la expresión de resistencia bacteriana, surgieron como atractivos los PAs, entre ellos las bacteriocinas. Para esto se evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de PAs producidos por bacterias ácido lácticas regionales frente a cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina.

## **I.2. Hipótesis de trabajo**

Existe una actividad antibacteriana *in vitro* de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas regionales frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina que debe ser considerada para su empleo terapéutico, como alternativa a los tratamientos antimicrobianos convencionales, de modo de contribuir a la disminución de la expresión de resistencia bacteriana.

## **I.3. Objetivos**

Se plantea como objetivo general, cuantificar la actividad antibacteriana *in vitro* de las bacteriocinas procedentes de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina.

A su vez, los objetivos específicos son:

- Estimar la prevalencia de mastitis y analizar los factores de riesgo de infecciones intramamarias producidas por *S. aureus*, en vacas en período de lactancia procedentes de los tambos localizados en el Departamento Río Segundo, Córdoba.
- Evaluar la susceptibilidad (en forma cuantitativa) de los aislamientos de *S. aureus* regionales, frente a agentes ATMs de uso frecuente en producción bovina lechera (penicilina G, ampicilina, cloxacilina, tilosina, oxitetraciclina, y gentamicina).
- Aislar e identificar las BAL, procedentes de la leche de los animales de la región, con capacidad de producir las bacteriocinas objeto de estudio.
- Identificar la/s bacteriocina/s y estimar su/s concentración/es inhibitoria/s mínima/s frente a los aislamientos de *S. aureus*.

## CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### II.1. Panorama global y regional de la producción láctea

A nivel mundial se observa una gran variedad de productos lácteos que cambia considerablemente de región a región y entre países de una misma región, siendo condicionadas por los hábitos alimentarios, las tecnologías disponibles de elaboración, la demanda del mercado y las circunstancias sociales y culturales. Según la FAO (2016), en los países en desarrollo como los situados en el Mediterráneo o el Cercano Oriente, el subcontinente indio, regiones de África occidental y oriental, y parte de América latina la leche es producida por pequeños agricultores generando ganancias relativamente rápidas que favorecen a la sustentación de la vida cotidiana. La mala calidad de los recursos forrajeros, las enfermedades, el acceso limitado a mercados y servicios, el reducido potencial genético de los animales lecheros y en muchos casos las condiciones climatológicas desfavorables (climas cálidos o húmedos), son limitantes de la productividad lechera en los países en desarrollo. Sin embargo, todas estas situaciones varían considerablemente en los países desarrollados, constituyéndose en los principales actores del mercado mundial de productos lácteos (Estados Unidos de América, la Unión Europea, Nueva Zelanda y Australia).

La Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) (2015) reveló que durante 2014 se produjeron 802 millones de toneladas de leche. De este modo el mercado mundial incrementó la oferta de leche en 3,3 % por encima de los niveles de 2013. El comercio internacional mostró un incremento del 9 % de la producción mundial. Sin embargo, en 2015 se manifestó en caída continua. Con respecto al consumo per cápita promedio global, en 2014 fue de 110,7 kg y según OECD/FAO incrementaría 13,7 % hacia 2023 debiendo aumentar más en los países en desarrollo. Las proyecciones internacionales esperan 9 mil millones de habitantes para 2050 y por lo tanto un incremento de las necesidades de alimentos para las próximas décadas. El crecimiento de la producción se sustenta en la expansión del rodeo lechero mundial y en el aumento de los rendimientos individuales por vaca. Para el período 2015 - 2024 se prevé que la producción aumente en todas las regiones del mundo con un incremento en la media anual del 1,8 %, siendo

los países en desarrollo los que aporten la mayor parte de la leche adicional producida. El continente asiático podrá ser el responsable de la mayoría del aumento, del cual India puede transformarse en el principal productor del mundo superando a la Unión Europea. Según datos del Observatorio del Mercado de la Leche (MMO), India en el 2015 tuvo la producción más alta a nivel mundial como producto de las condiciones favorables de la temporada, junto con los bajos costos de los insumos y la lenta disminución del precio de la leche.

En este escenario global, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA (2016), Argentina produjo en 2015 aproximadamente 11,49 millones de toneladas, 1,5 % más que en 2014. Para 2016 se espera un ligero crecimiento, con un volumen que rondará los 11,67 millones de toneladas; las exportaciones de productos lácteos alcanzarían las 270.000 toneladas; y habrá una reducción en el rodeo lechero de 1,88 millones de cabezas a 1,82 millones, asociado principalmente a una reducción en la reposición de las vacas lecheras.

La obtención primaria de leche en Argentina (figura 1) se concreta principalmente en las provincias de Córdoba (37 %), Santa Fe (32 %) y Buenos Aires (25 %), en menor medida en Entre Ríos (3,1 %) y La Pampa (1,4 %), y el resto en centros productivos regionales tales como los existentes en Tucumán y Santiago del Estero (INTA, 2011). En el caso de la provincia de Córdoba, la producción total se distribuye en sus tres cuencas lecheras: Noreste (44 %), Villa María (43 %) y la cuenca Sur (13 %) (INTA, 2011; Dirección General de Estadísticas y Censos, de la provincia de Córdoba, 2015).



Figura 1. Distribución de las principales cuencas lecheras en Argentina (INTA, 2011).

Cabe destacar que existe una gran diversidad entre los rendimientos según la provincia que se considere y también entre zonas de una misma provincia.

La importancia que conlleva este sector productivo requiere del trabajo multidisciplinario para la definición del rumbo del sector agroalimentario y agroindustrial en los próximos años. Para esto será primordial la participación del estado como promotor de la articulación entre los distintos actores, como regulador y moderador de los intereses sectoriales y como garante de las reglas pautadas para la superación de la industria lechera. Las estrategias deben apuntar a poder concretar cambios profundos en los sistemas productivos lecheros tendientes a lograr optimización y mejorar la calidad de la leche, lo cual es garantía de un producto confiable, sano y que cumple con los requisitos de aceptación del cliente. Por lo tanto la salud de la ubre juega un papel esencial en este análisis. Bien es conocido que la mastitis es una enfermedad que no solo causa disminución en la producción lechera sino que también induce a una depreciación de la calidad de la leche, condicionando la duración de la lactancia en las vacas lecheras afectadas y por ende generando una pérdida económica importante.

## **II.2. Mastitis bovina**

La mastitis es la enfermedad productiva de mayor prevalencia global en los rodeos lecheros, presentándose en forma endémica en gran parte del mundo (Calderón & Rodríguez, 2008; Ruiz *et al.*, 2012; Asli *et al.*, 2017). La disminución en la producción de láctea, la leche que se descarta, los animales eliminados prematuramente de la línea de ordeño y el gasto en medicamentos y honorarios veterinarios, favorecen a que sea una de las enfermedades más costosas en la industria lechera, aun a pesar de los métodos modernos establecidos para su control (Valero-Leal *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2015).

La Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) definió a la mastitis como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria. Su etiología puede ser infecciosa, traumática o tóxica, aunque prioritariamente por invasión de bacterias patógenas a través del orificio y el canal del pezón. En esta enfermedad, existen cambios físicos y/o químicos en la glándula mamaria que determinarán el desarrollo clínico o subclínico de la mastitis, dependiendo de la naturaleza del agente causal (capacidad de infección, multiplicación y extensión) y del estado inmunológico, particularmente de la ubre.

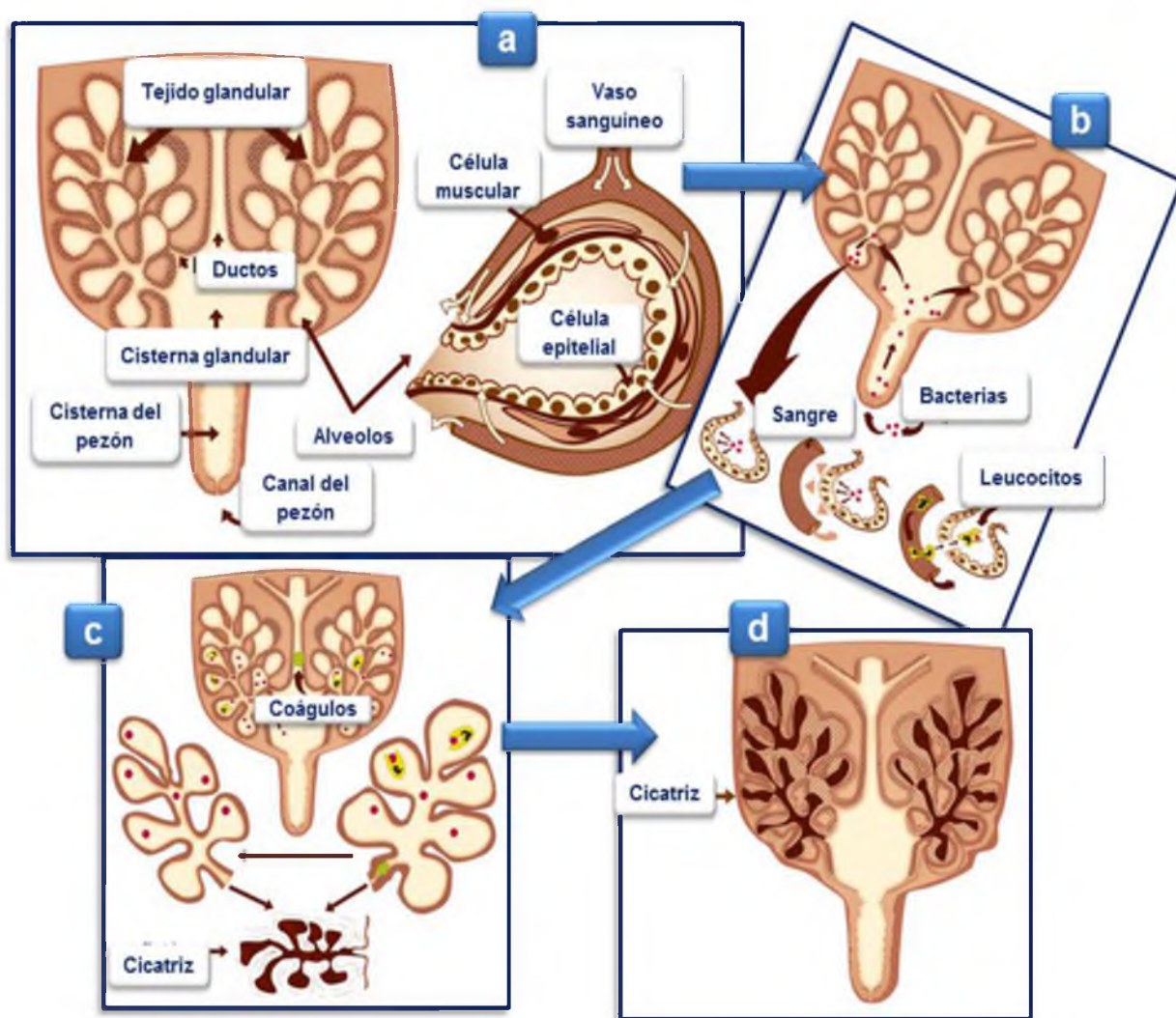


Figura 2. Patogenia de la mastitis bovina.

(a) Interior de cada cuarto mamario. (b) Ingreso de la bacteria a través del canal del pezón y multiplicación en cisternas del pezón y glándula (las bacterias están representadas por puntos rojos, las toxinas producidas por las bacterias, por flechas pequeñas, y los leucocitos por puntos amarillos). (c) Presencia de bacterias, toxinas bacterianas, y leucocitos en el tejido afectado (d) Formación de cicatriz (Alta, 2012).

Tal como se puede observar en la figura 2, el interior de cada cuarto está compuesto por la cisterna del pezón, cisterna de la glándula, ductos de leche y tejido glandular que contiene millones de alveolos. Cada alveolo está rodeado con células epiteliales que producen leche que a la vez están rodeadas de células musculares que se contraen y expulsan leche de los alveolos durante el ordeño. La bacteria ingresa a través del canal del pezón y se multiplica en las cisternas del pezón y glándula, pudiendo traspasar el canal del pezón durante el ordeño y entre los ordeños. Las bacterias inicialmente afectan a los tejidos que rodean los grandes ductos y cisternas que recogen la leche causando daño a pequeñas áreas de tejido. Eventualmente progresan a afectar al



tejido glandular y alveolos. Las toxinas producidas por las bacterias causan daño a las células epiteliales que producen leche. Esto resulta en la liberación de sustancias en el torrente sanguíneo que incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Los leucocitos (células somáticas) se trasladan desde los vasos sanguíneos hacia los alveolos donde atrapan bacterias. Sin embargo, los leucocitos también causan mayor daño a las células productoras de leche como parte del proceso inflamatorio. La presencia de bacterias, toxinas bacterianas, y leucocitos en el tejido afectado puede causar que el tejido saludable productor de leche revierta a un estado inactivo. Los alveolos se reducen en tamaño y dejan de producir leche. En otras áreas, restos de coágulos, leucocitos, y bacterias taponan ductos que drenan áreas de tejido glandular. Si persisten los coágulos, la leche se acumula en los alveolos que se hinchan y ejercen presión sobre células productoras de leche y los alveolos retornan a un estado no productivo. Si las bacterias y sus toxinas se mantienen en contacto con los alveolos, las células productoras de leche son destruidas y reemplazadas por cicatriz, y consecuentemente el cuarto produce menos leche o se convierte en no funcional (Alta, 2012).

Como se verá más adelante, la existencia de factores predisponentes relacionados al medioambiente o al manejo del rodeo (condiciones de estabulación, higiene de la ubre y de la máquina de ordeñar, entre otros), pueden incrementar la frecuencia de presentación de la enfermedad (López Rodríguez, 2014; Martínez Pacheco *et al.*, 2015; Vissio *et al.*, 2015).

En la presentación subclínica, como su nombre lo sugiere, no se perciben signos compatibles con un proceso inflamatorio en la ubre, ni cambios visibles en la leche; sin embargo se observa una disminución de la producción y la calidad de la leche. El análisis bacteriológico de la leche suele demostrar la presencia de algún microorganismo y conjuntamente se acompaña de un aumento en el recuento de células somáticas (RCS). Su importancia epidemiológica es evidente, debido a que al no ser detectable en forma clínica, conlleva a que los individuos afectados se conviertan en fuentes de infección para animales susceptibles, determinando que ésta sea la forma más persistente dentro del ganado lechero. Debido a ello, el tipo subclínico es entre 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica (Fernández Bolaños *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2014).

Por otra parte, la mastitis clínica se caracteriza por anormalidades visibles tanto en la ubre como en la leche. Se supone aguda cuando se presenta súbitamente, y crónica cuando la infección es de larga duración, con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre. Es característico que la ubre presente calor, hinchazón, enrojecimiento y

sensibilidad al tacto (figura 3). El cuadro se acompaña de una reducción en la capacidad funcional de la glándula mamaria y por ende una menor producción de leche, en la que se manifiestan cambios en su composición y se altera su apariencia (presencia de grumos, coágulos y aspecto aguado). Se eleva la carga bacteriana normal, las células somáticas (principalmente neutrófilos polimorfonucleares) y el contenido de proteasa. Las vacas pueden estar sistémicamente afectadas, manifestando fiebre, deshidratación, anorexia, toxemia, depresión y postración, pudiendo culminar en bacteriemia, septicemia y muerte del animal (Fernández Bolaños *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Giannechini *et al.*, 2014).



Figura 3. Ubre característica con mastitis clínica (Alta, 2012).

Ambas modalidades (clínica y subclínica) son epidemiológicamente heterogéneas entre regiones y países. La productividad y la calidad de la leche varían notablemente hasta dentro de una misma región, por lo que es difícil establecer patrones de producción. Es aquí cuando cobra importancia el estudio de los factores de riesgo ya sean del animal, del ambiente o del agente patógeno de cada región asociados al establecimiento de la mastitis bovina. Factores relacionados al manejo del rodeo lechero son relevantes en la presentación de la enfermedad; entre ellos se citan a los perfiles de los productores (capacitación e interés por establecer cambios que favorezcan el control de la mastitis), el acceso a la asistencia técnica, a los programas regionales de control sanitario del rodeo y las diversas políticas establecidas por las lecherías receptoras de la producción.

Desde el punto de vista sanitario resulta importante el estado de salud de las ubres y la calidad de la leche que se produce, lo cual puede ser estimada a través del RCS y la valoración de la carga bacteriana que varían significativamente dependiendo de estas condiciones (Ruiz *et al.*, 2011). También es importante comprender los períodos en que la vaca corre mayor riesgo de infección, ya que por ejemplo, son especialmente susceptibles durante el período periparto y el secado, debido a los cambios estructurales que se producen en la glándula mamaria. Una disminución en el número y funcionalidad de las células blancas de la sangre causada por la interacción con hormonas específicas durante estas etapas son los resultados de un sistema de defensa comprometido (Vangroenweghe *et al.*, 2005; Meikle *et al.*, 2013; Pereyra *et al.*, 2014).

Una vaca se puede recuperar de la mastitis de forma espontánea, pero por lo general, esto ocurre en los casos leves de la presentación subclínica. Se debe considerar que la desaparición de los signos clínicos no siempre es indicativo que la infección ha remitido. Si bien la leche puede tener una apariencia normal, el RCS puede permanecer elevado por lo que en casos como este, se estaría frente a un estado subclínico, situación común para los casos de mastitis subclínica generados por los patógenos Gram positivos. La capacidad de lograr una curación bacteriológica dependerá del agente patógeno, la gravedad del caso, la variación en la respuesta inmune en las vacas, la eficacia del protocolo de tratamiento y la rapidez con que se instaure este último. De todas formas, se advierte que la curación bacteriológica es más probable en los casos de mastitis que se dan por primera vez que en los casos recurrentes (Pinzón Sánchez *et al.*, 2011; Ruegg, 2012).

### **II.2.1. Agentes etiológicos de mastitis bovina**

La mastitis puede ser causada por más de 140 microorganismos diferentes, entre los que se incluyen patógenos contagiosos, bacterias del medio ambiente, bacterias oportunistas y otros organismos que entran en la glándula mamaria a través del canal del pezón, se multiplican rápidamente y dan lugar a inflamación con daño tisular (Fernández Bolaños *et al.*, 2012).

El reservorio de los microorganismos ambientales es el hábitat donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas, siendo por lo general transmitidos entre períodos de ordeños. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp) *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp) y en menor medida los coliformes.

Los principales patógenos contagiosos son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma*; tienen su hábitat en la glándula mamaria bovina y se transmiten de ubre a ubre principalmente durante el ordeño de las vacas. Estos microorganismos se han adaptado a las condiciones de la glándula mamaria, desarrollando estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la misma. Dentro del grupo de oportunistas que provocan mastitis están los estafilococos coagulasa negativos (CNS), considerados en la actualidad, patógenos emergentes de la mastitis bovina. Normalmente estos microorganismos se encuentran en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador desde donde logran colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores. Con menor frecuencia pueden causar mastitis microorganismos de los géneros *Actinomyces*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Pasteurella* y *Protothecas* y levaduras como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. Para estos microorganismos la tasa de curación terapéutica suele ser prácticamente nula, independientemente del tratamiento, por lo que en muchos casos se debe sacrificar al animal infectado (Fernández Bolaños *et al.*, 2012; Martínez Pacheco *et al.*, 2013).

En Argentina los microorganismos más prevalentes en mastitis subclínica son *S. aureus* y *Streptococcus* spp, mientras que en mastitis clínica son *S. aureus*, *S. agalactiae*, CNS, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Escherichia coli* y coliformes (Martínez Pacheco *et al.*, 2013).

### **II.2.2. Mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus***

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), las enfermedades de origen alimentario (o enfermedades transmitidas por los alimentos; ETAs) abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial dada su elevada magnitud y la complejidad de su intervención. Las ETAs se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso, que va de la producción al consumo de alimentos. Son la principal causa de enfermedad y muerte asociadas a una carga socio-económica significativa en los países menos desarrollados. Mientras que en los países desarrollados, son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad de los alimentos.

Dentro de los agentes etiológicos más importantes de ETAs en el mundo se encuentra *S. aureus* (Alerte *et al.*, 2010; Olea *et al.*, 2012), considerado la tercera causa más común de

intoxicación alimentaria confirmada en el mundo. Es causante de una gran variedad de serias enfermedades en personas y animales. Las vacas suelen ser portadoras de esta bacteria. Pereyra *et al.* (2014), afirman que dentro de los patógenos contagiosos causantes de mastitis, *S. aureus* es el agente etiológico más prevalente tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero pudiendo ser un contaminante tanto de la leche como de sus derivados.

El género *Staphylococcus* pertenece al orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae*. Incluye a 35 especies y 17 subespecies, dentro de las que se han descrito 18 especies de *Staphylococcus* de importancia en alimentos, entre las que se halla *S. aureus*, que por las características psicrotróficas y halotolerante de la mayoría de las cepas, su crecimiento es difícil de controlar. Los estafilococos son contaminantes del medio ambiente y habitantes normales de las superficies corporales de la mayoría de los animales de sangre caliente, encontrándose en las mucosas y en la piel. Los *S. aureus* son cocos Gram positivos, crecen aislados, en parejas, en tétradas o en masas irregularmente agrupadas como racimos de uvas, son anaeróbicos facultativos, fermentadores de manitol, oxidasa negativo, productores de coagulasa y catalasa, inmóviles, no esporulados y necesitan de una fuente nitrogenada orgánica para su supervivencia. Poseen una gran versatilidad metabólica pudiendo adaptarse a una variedad de condiciones ambientales (temperatura, pH, etc.) en la que puede crecer y producir enterotoxinas (Cervantes-García *et al.*, 2014).

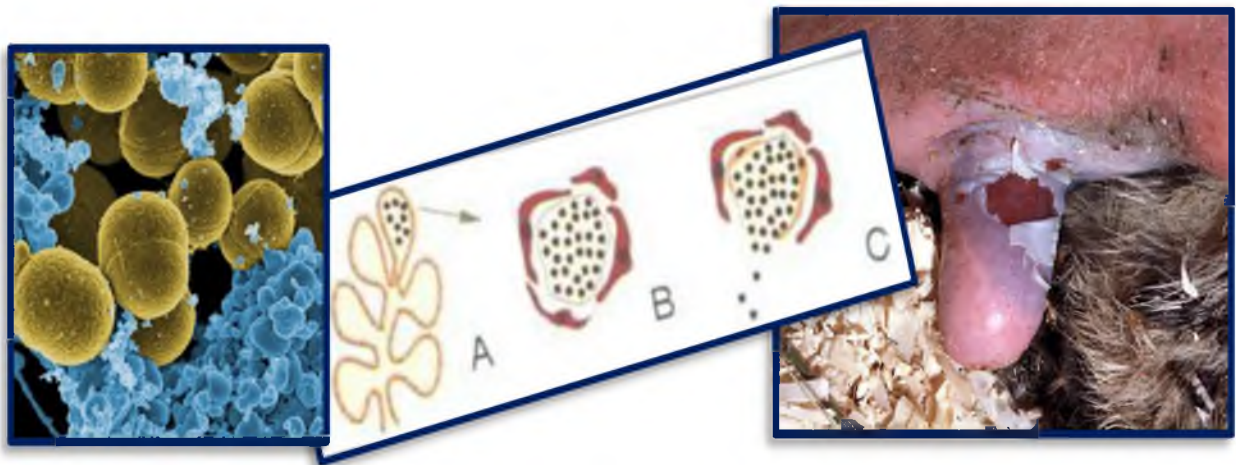


Figura 4. Invasión del tejido mamario por *S. aureus*.

A-Tejido glandular de la ubre colonizado por *S. aureus*. B-Formación de bolsones que contienen *S. aureus*, a veces inaccesibles a su destrucción, ya sea natural o por antibióticos. C- Ruptura de bolsones, liberación y diseminación de *S. aureus* (Andresen, 2012).

Debido a que la piel de los pezones es el principal reservorio de *S. aureus*, favorece la persistencia de las infecciones intramamarias. Si bien no es un patógeno obligado de la ubre, ha sido demostrada su capacidad para infectar el epitelio mamario bovino *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células. Por el contenido de lactosa, oligosacáridos y minerales, la leche y sus productos derivados pueden ser medios de cultivos ideales para la proliferación del *S. aureus* (Zschöck *et al.*, 2011; Fernández Villa *et al.*, 2014; Herrera & Santos, 2015; Asli *et al.*, 2017). Este microorganismo se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas o en los equipos de ordeño. Es capaz de colonizar las heridas de la piel y las hiperqueratosis en los esfínteres de los pezones producidas como consecuencia del ordeño (Hamid *et al.*, 2017) (figura 4).

En los países en desarrollo, *S. aureus* juega un rol importante como agente causal de la mastitis subclínica, siendo los animales infectados una de las principales fuentes de contaminación de la leche cruda (Asli *et al.*, 2017). *S. aureus* es capaz de producir una serie de factores de virulencia que contribuyen a causar y mantener una IIM. Según Pereyra *et al.* (2014) la patogenicidad de *S. aureus* es un proceso complejo y multifactorial, resultado de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección en distintos órganos y hospedadores (tabla 1). Sustentan su patogenicidad la capacidad de adhesión intercelular, de colonizar células epiteliales y macrófagos de la glándula mamaria y la habilidad de producir fibrosis y micro abscesos que dificultan el acceso de los ATMs.

La mastitis causada por *S. aureus* es contagiosa y su tratamiento suele ser problemático, debido a la aparición de cepas productoras de enzima betalactamasa, resistentes a agentes ATMs (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2013). La habilidad para invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente, formando unaseudocápsula (no se forma en los cultivos *in vitro*) a base de exopolisacáridos, interfiere con la fagocitosis. Esto le confiere una protección a la respuesta inmune humoral del hospedador y al tratamiento con ATMs, resultando inefectivo el control a través de medidas preventivas y terapéuticas tradicionales, tendiendo a producir infecciones intramamarias crónicas, que pueden ocasionar daños permanentes al tejido mamario (Pereyra *et al.*, 2014; Asli *et al.*, 2017). Esto transforma a la mastitis en un problema persistente, donde *S. aureus* se transmite fácilmente en el rodeo durante las prácticas de ordeño.

Tabla 1. Determinantes de patogenicidad de *S. aureus*.

Determinantes de patogenicidad		Propiedades
<b>Componentes de la pared celular</b>	Peptidoglicano	Activación del complemento
	Ácidos teicoicos	Antifagocítica
	Proteína A	Antifagocítica
	Capsula mucoide	Adherencia
<b>Enzimas</b>	Coagulasa	Formación de abscesos
	Estafiloquinasa	Destrucción de coágulos
	Hialuronidasa	Invasión hística
	Lipasas	Colonización
<b>Toxinas</b>	Hemolisinas	Rotura de la membrana celular
	Leucocidina	Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos
	Toxina exfoliativa	Epidermólisis
	Toxina del shock tóxico	Shock
	Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria

(Seija, 2006; Cervantes-García *et al.*, 2014)

Dentro de las medidas alternativas que permiten una reducción de la prevalencia de mastitis, tendiendo a un menor uso de ATMs, está la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos. Se han desarrollado métodos para elevar la respuesta inmunogénica a los exopolisacáridos, que de por sí es muy débil y protege al germen de los mecanismos de defensa de la ubre. Aunque esto constituye la base para la generación de vacunas contra mastitis aún está por resolverse la identificación de todos los serotipos capsulares causantes de la mastitis para la elaboración de vacunas más efectivas. Casi un 60% de los antígenos capsulares aún no han sido tipificados. En las últimas décadas se han desarrollado diversas vacunas experimentales (Camussone & Calvino, 2013; Peña & Uffo, 2013). Algunas de ellas, compuestas por bacterinas o lisados de cultivos de *S. aureus*, alcanzaron la fase de comercialización. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento con estos inmunógenos muestran un control parcial de la infección. Actualmente se sigue trabajando en el desarrollo de nuevas alternativas para mejorar el desempeño de las bacterinas disponibles, elaborándose prototipos de vacuna contra infecciones intramamarias bovinas causadas por *S. aureus*. Fundamentalmente la oferta comercial para inmunización de vacas en explotaciones lecheras con problemas de mastitis recurrentes, apunta a reducir la incidencia de mastitis

subclínica y la incidencia y gravedad de los signos clínicos de la mastitis clínica causada por *S. aureus*, coliformes y estafilococos coagulasa negativos (Andresen, 2012; Camussone, 2013). Otras acciones dirigidas a la mejora de las defensas del hospedador incluyen el agregado de selenio y vitamina E a las raciones de alimentos y la mejora de la nutrición en general en los períodos de alto riesgo (proximidad al parto y períodos de secado) (Ramos *et al.*, 2013; Reinoso & Soto, 2015).

El diagnóstico de *S. aureus* es relevante para la implementación de estrategias de manejo del rodeo frente a la enfermedad, previniendo la diseminación de este patógeno en el resto del rodeo. Es por ello que en la adopción de un programa de control y prevención de la mastitis se deben considerar las características de los patógenos involucrados para que el programa sea lo más eficiente posible (Ruiz *et al.*, 2011; Valero-Leal *et al.*, 2012). Sin embargo, si bien es relevante el desarrollo y valoración de protocolos terapéuticos para la mastitis clínica, la capacidad de evaluar los resultados del tratamiento es a menudo limitada debido a la insuficiencia de registros (Hoe & Ruegg, 2006; Reyes, 2015). Cobra entonces importancia la planificación de las prácticas de ordeño que incluyan: una higiene adecuada tanto del alojamiento de los animales, las máquinas ordeñadoras como del personal a cargo del tambo; el lavado, secado y desinfección de los pezones después del ordeño; la eliminación y evaluación visual de los primeros chorros de leche preordeño; el uso de selladores; la utilización de equipos de ordeño adecuados con mantenimiento funcional habitual y cambio periódico de pezoneras y piezas de hule; el ordeño de las vacas de primera lactancia en grupo aparte (si fuera posible) para evitar contagios del hato adulto; la identificación clara de los animales bajo tratamiento, los cuales deben ser ordeñados últimos y la leche descartada durante el tiempo recomendado por el laboratorio elaborador del producto antibiótico; la realización de pruebas periódicas de detección de mastitis subclínica y su tratamiento; la detección y eliminación rápida del rodeo de aquellas vacas con un diagnóstico positivo de *S. aureus* y el tratamiento a tiempo de la mastitis clínica durante el período seco y durante la lactancia (Gasque Gómez, 2008; Martínez Pacheco *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015; Vissio *et al.*, 2015).

### **II.3. Terapéutica antimicrobiana**

Los fármacos ATMs juegan un rol importante en el control de las infecciones bacterianas. La base para la elección de los mismos se focaliza en la relación íntima sucedida en la tríada bacteria-ATM-animal. Ante una enfermedad, además de un correcto diagnóstico, se debe



contemplar las características del agente bacteriano y la actividad *in vitro* del principio ATM. Así se conforman los modelos farmacocinéticos / farmacodinámicos (PK / PD), que relacionan las concentraciones efectivas y el tiempo de dicho ATM alcanzadas en el sitio de infección en un individuo y la ausencia de efectos adversos indeseables (farmacocinética; vías de administración, biodisponibilidad, unión a las proteínas, distribución en los tejidos, volumen de distribución, metabolismo, excreción, efectos tóxicos del antibiótico sobre el huésped); como así también, su acción sobre la población de bacterias (farmacodinamia que describe la compleja interrelación que se establece entre el perfil farmacocinético del antimicrobiano y la susceptibilidad *in vitro* de la bacteria) (Nicola & Casellas, 2012). Cabe destacar que el grado de inmunocompetencia del animal que recibe el tratamiento es de suma importancia en la elección del esquema posológico. La interacción entre estas características conforman un triángulo que son la base de una terapéutica racional (Davis *et al.*, 1968) (figura 5).

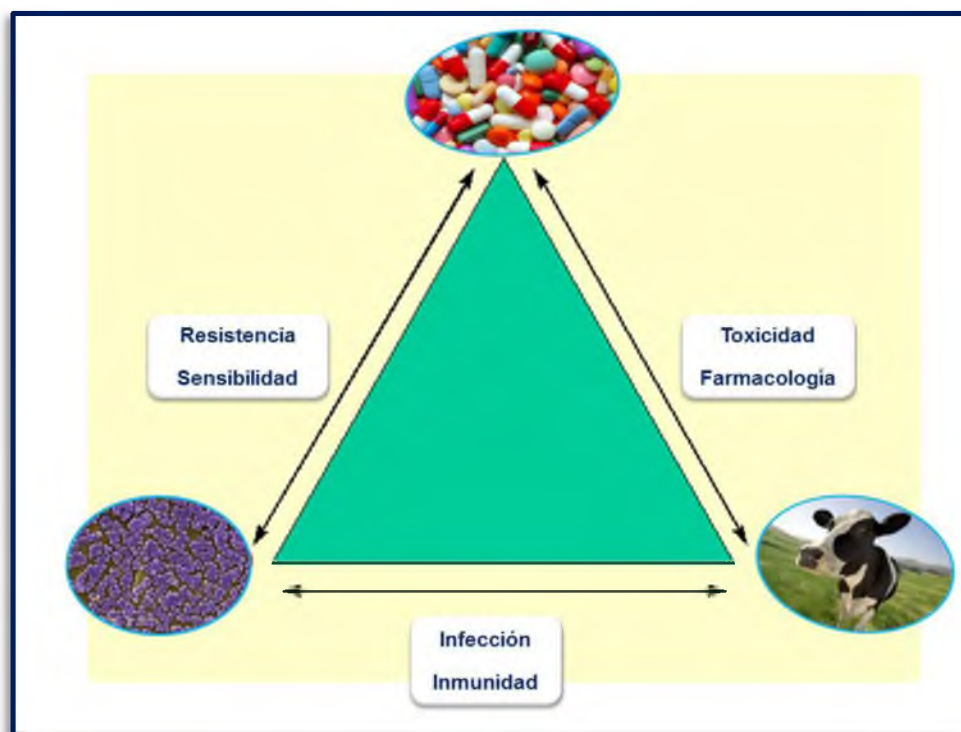


Figura 5. Triángulo terapéutico de los principios de la terapia antimicrobiana.

Numerosos grupos de ATMs se han desarrollado desde el descubrimiento de la penicilina. Lamentablemente y como se ampliará en el apartado correspondiente (*vide infra*), su uso desmedido a nivel global, tanto en veterinaria como en salud pública ha traído aparejado la

proliferación de cepas bacterianas resistentes. Esto amenaza contra la eficacia de los ATMs, considerándose por tanto éste fenómeno un tema prioritario de investigación y de desarrollo de prácticas de buen uso por entidades de referencia como lo son la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) y la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2015).

Para saber si un microorganismo responderá a la terapia antimicrobiana existen diversos métodos que permiten establecer el punto de corte entre las poblaciones bacterianas sensibles, intermedias o resistentes. Tanto el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST), como el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio estadounidense (*Clinical Laboratory Standards Institute*; CLSI) han publicado procedimientos de referencia para conocer la sensibilidad a los ATMs, métodos que se revisan y actualizan periódicamente. Esto se consigue con el monitoreo permanente de la aparición de nuevos mecanismos de resistencia, logrando un mejor entendimiento de los determinantes farmacológicos de respuesta terapéutica, mejorando así la práctica clínica (Esparza *et al.*, 2014). Tras la estandarización, el objetivo de ambos comités es el de establecer puntos de corte para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad. Los procedimientos de EUCAST y CLSI para definir puntos de corte son muy similares y se fundamentan en el análisis de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) bacterianas (definidas como la menor concentración del fármaco que previene el crecimiento de un patógeno específico, detectado a simple vista), así como en la aplicación de diferentes variables farmacocinéticas y farmacodinámicas que permiten relacionar los resultados del antibiograma con la respuesta clínica a un determinado ATM. Asimismo se definen los puntos de corte epidemiológicos calculados con base en los datos de la distribución de las CIMs (figura 6).

En este caso y a diferencia de los puntos de cortes clínicos antes mencionados, el objetivo es evaluar la evolución de las poblaciones bacterianas que van adquiriendo mecanismos de resistencia. El punto de corte epidemiológico es aquel valor de referencia que establece la diferenciación de la población bacteriana sensible (denominada cepa originaria, silvestre, salvaje o *wild type*) de aquella que adquiere resistencia (Canut & Martínez-Martínez, 2014).

Los puntos de corte disponibles hoy en día se caracterizan por ser específicos para cada especie bacteriana, por estar basados en un conjunto de datos epidemiológicos, farmacodinámicos y clínicos, y por ser revisados periódicamente según se va disponiendo de nuevos datos procedentes de estudios de epidemiología molecular y del análisis de su correlación clínica (Cuenca-Estrella, *et al.*, 2013).

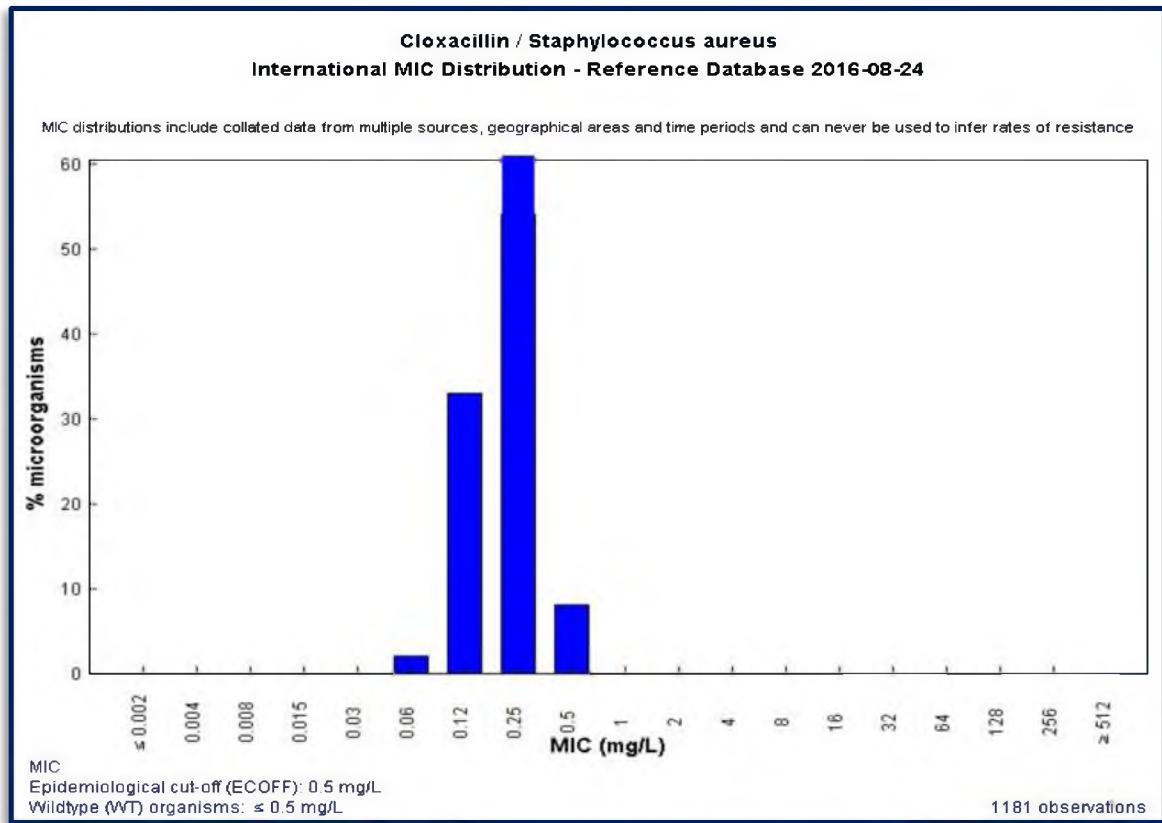


Figura 6. Puntos de corte epidemiológico (CUT-OFF) para cloxacilina frente a *S. aureus* según EUCAST (2016).

### II.3.1. Terapéutica antimicrobiana en mastitis bovina.

La terapia antibiótica es un componente necesario dentro de los programas de control de mastitis. Tanto en la prevención como el tratamiento el principal objetivo es eliminar al organismo invasor mediante la aplicación de ATMs, administrando una cantidad óptima de droga activa en el sitio de la infección, que supere y mantenga por un tiempo adecuado una concentración capaz de inhibir al organismo actuante. En mastitis es importante lograr que la glándula mamaria y la leche producida retornen a los niveles normales, que se mantenga el potencial de producción, que el tratamiento arroje un saldo positivo sin perjuicios económicos para el productor y la industria láctea y que los riesgos de aparición de residuos en la leche por el uso de ATMs sean mínimos, disminuyendo así los riesgos para la salud pública (Giannechini *et al.*, 2014; Pyörälä, 2016).

Es determinante conocer la susceptibilidad de los gérmenes actuantes frente a los ATMs como así también los niveles esperados de ATM en el sitio de infección luego de su

administración. El fármaco ideal deberá tener la menor CIM en contra de la mayoría de los patógenos de la ubre, pero ningún fármaco puede ser eficaz contra todos los patógenos y la mayoría deben ser utilizados en combinaciones y diferentes formulaciones para aumentar la eficacia y la biodisponibilidad en el tejido de la ubre. Los distintos ATMs utilizados tienen diferentes mecanismos de acción y la mayoría son de amplio espectro que actúan contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. La eliminación total del uso de ATMs para el tratamiento de la mastitis es improbable ya que las prácticas modernas y la alta demanda dictan estrategias de tratamiento rápido e intensivo que involucran el uso de terapia con ATMs tanto en la lactancia como en los períodos secos (Pyörälä, 2016).

El tratamiento se lleva a cabo mediante la aplicación de terapias sistémicas o locales. Los ATMs se administran durante la lactancia solo si se está frente a un cuadro de mastitis clínica mientras que la terapia de vaca seca puede ser utilizada para tratar infecciones existentes o de forma profiláctica para reducir la probabilidad de nuevas infecciones en desarrollo previniendo así una infección mayor (Pellegrino *et al.*, 2011). La administración de fármacos en el periodo seco, además de poder hacerse directamente en el canal del pezón en forma de infusiones intramamarias, se puede administrar por vía parenteral, intravenosa o intramuscular (Calvinho *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2014). En este período el uso de selladores de pezones que actúan como un tapón impermeable imposibilitan que otros agentes patógenos se introduzcan en el pezón, lo que da como resultado la formación de una barrera física contra los microorganismos invasores evitando así nuevas infecciones (Ríos *et al.*, 2013). La vía de elección para mastitis subclínica es usualmente por infusión intramamaria y en el caso de la mastitis clínica aguda severa suele ser necesaria una combinación de tratamiento parenteral e intramamario. (Pyörälä, 2016).

Es de fundamental importancia determinar qué tipo de agente etiológico predomina en cada rodeo, cuáles son las drogas que tienen mayor penetración y distribución en el tejido mamario (tabla 2) y las indicaciones higiénicas para su aplicación (Giannechini *et al.*, 2014; Pyörälä, 2016). Los medicamentos que se administran por vía parenteral deben pasar del sistema circulatorio a la leche y de esta a los tejidos atravesando membranas lipídicas. La fracción activa del fármaco debe estar no-ionizada, obligadamente no debe ser proteico y ser soluble en lípidos para poder atravesar la barrera de sangre a leche (Ziv, 1980).

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su capacidad de distribución en la ubre luego de su administración extramamaria.

Alta	Media	Baja
Lincomicina Trimetoprim	Ampicilina Tetraciclina Novobiocina Cefalosporina	Kanamicina Gentamicina Polimixina

(Gasque Gomez, 2008).

Los ATMs que se administran a través de la abertura del pezón (tabla 3) deben llegar al sitio de la infección en el canal del pezón o cisterna superior, pero a menudo la distribución es desigual, ya que donde hay una inflamación importante e hinchazón, la difusión a través de los conductos mamarios puede estar bloqueada, alterando el movimiento del agente terapéutico (Asli *et al.*, 2017).

Tabla 3. ATMs de uso intramamario.

<b>BETALACTAMICOS</b>	Penicilina G Cloxacilina Otras penicilinas y cefalosporinas
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>	Neomicina Estreptimicina, dihidroestreptomicina Kanamicina
<b>MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS</b>	Espiramicina Eritromicina Lincomicina

(Sani, 2016; VEVPA, 2016)

En el caso de infección por *S. aureus*, la interacción con ATMs se ve alterada debido a la formación de una cicatriz fibrosa en los tejidos. El tejido de la cicatriz puede no tener suministro de sangre lo que hace que la terapia con medicamentos por vía intramuscular o intravenosa sea menos eficaz. Algunas bacterias pueden evadir las interacciones con ATMs si son devoradas por los macrófagos, dentro de los cuales permanecen activas pudiendo causar infecciones recurrentes una vez que el ATM ha sido eliminado de la zona (Pereyra *et al.*, 2014). La formación de

biopelículas en el canal del pezón cuando las bacterias se adhieren en la superficie del epitelio también puede contribuir a la ineficacia de las infusiones intramamarias (Castelani *et al.*, 2015).

Hay factores de la vaca que deben ser considerados antes de iniciar un tratamiento de mastitis pues condicionan los resultados del tratamiento, como lo son la edad y el número de partos. Se observa que cuanto más edad tenga la vaca, mayor será el riesgo de tener mastitis subclínica o clínica, que cuanto más número de lactaciones, responden peor al tratamiento en comparación con el ganado joven y que la curación bacteriológica después de la terapia de mastitis es menor en vacas multíparas (Fernández Bolaños *et al.*, 2012; Ruegg, 2012). Para el caso de mastitis causada por *S. aureus* se han reportado por ejemplo niveles de curación para vacas en primera lactación del 77 a 91 %, mientras que para segunda y tercera lactación del 64 a 74 %, en tanto que para cuarta lactación solo del 47 al 50 % (Gasque Gomez, 2008).

También se deberá tener en cuenta el agente causante de la infección ya que en algunos casos se da una curación espontánea mientras que para otros patógenos (levaduras, *Pseudomonas*, micoplasmas, *Prototheca*, etc.) la tasa de curación terapéutica es prácticamente nula, independientemente del tratamiento. Esto queda expuesto por McDougall *et al.* (2007) quienes obtuvieron diferentes tasas de curación bacteriológica dependiendo del agente patógeno a posterior del tratamiento: *S. uberis* (89 %, n = 488); *S. dysgalactiae* (69 %, n = 32); *S. aureus* (33 %, n = 40) y *estafilococos coagulasa negativo* (85 %, n = 71). Entonces, para poder determinar el tipo de medicamento a utilizar para tratar una infección es necesario identificar a los agentes patógenos causantes contando con un diagnóstico preciso.

### **II.3.2. Resistencia bacteriana hacia los antimicrobianos**

La resistencia bacteriana hacia los ATMs es una de las amenazas más apremiantes a la salud pública y animal en el mundo actual (OMS, 2015; OIE, 2015). La OMS (2015) define resistencia a los ATMs como la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable.

Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones propician la propagación de las resistencias. Los microorganismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden soportar ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y antipalúdicos. Esto hace que los tratamientos convencionales se vuelvan ineficaces y las infecciones persistan, incrementando el riesgo de propagación y dando lugar a una enfermedad prolongada, mayor riesgo de defunción y costos más elevados.

En el año 2015 la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) presentó un informe donde se revelaba que España era el país con la mayor resistencia a los ATMs (50 %) en cepas aisladas en humanos. Le seguían Francia (42 %) y Estados Unidos, Grecia y Portugal (30 %). Un importante grupo de países rondaban entre el 10 y 20 % de resistencia, como era el caso de Reino Unido y Austria (11 %) o Italia, Bélgica e Islandia (15 %). Dinamarca, Suecia y Finlandia, así como Australia y Alemania, todos por debajo del 10 % de resistencia. Siendo Países Bajos y Noruega los que tuvieron el menor registro de resistencia a los ATMs (0 %) (Redacción Médica, 2015).

Estos niveles alarmantes de resistencia a los ATMs han traído aparejado nuevos mecanismos que hacen prácticamente ineficaces a la última generación de ATMs constituyéndose como un problema crítico con severo impacto económico y social que pone en riesgo los adelantos de la medicina moderna (Tamariz *et al.*, 2014; Ortega *et al.*, 2017). Cabe recordar que a solo 6 años de que se comenzara a administrar penicilina, empezó a perder eficacia en el tratamiento de infecciones por estafilococo, en virtud de que este microorganismo desarrolló la enzima betalactamasa que degrada la principal estructura química de la penicilina, el núcleo betalactámico.

Las bacterias pueden tener resistencia natural o intrínseca a algunos ATMs, la que depende de la variabilidad genética que sufre en su evolución a través del tiempo, sin necesidad de exposición a estos ATMs. Por otro lado, la resistencia puede ser adquirida, generándose por mecanismos como pequeñas mutaciones (mutaciones puntiformes, a veces únicas), o grandes mutaciones (transposición o translocación de grandes cadenas) de su material genético. Otro mecanismo por el cual la bacteria puede adquirir resistencia es mediante la recepción de genes de la resistencia intra o inter- especies. Este intercambio de información genética, usualmente extra-cromosómico, se realiza mediante vehículos que trasladan el material de bacteria a bacteria, llamados integrones, bacteriófagos o transposones. Esto deja expuesto que la resistencia de un microorganismo a determinados ATMs puede suceder sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Echevarría Zarate & Iglesias Quilca, 2013).

El progresivo aumento de la resistencia a los ATM se sustenta en mutaciones genéticas que se suceden en las poblaciones bacterianas. En consecuencia, si la carga bacteriana en el sitio de infección excede la inversa de la frecuencia de mutación, indicaría que una pequeña subpoblación resistente ya coexiste con una mayor población susceptible al ATM que se administra en el tratamiento.

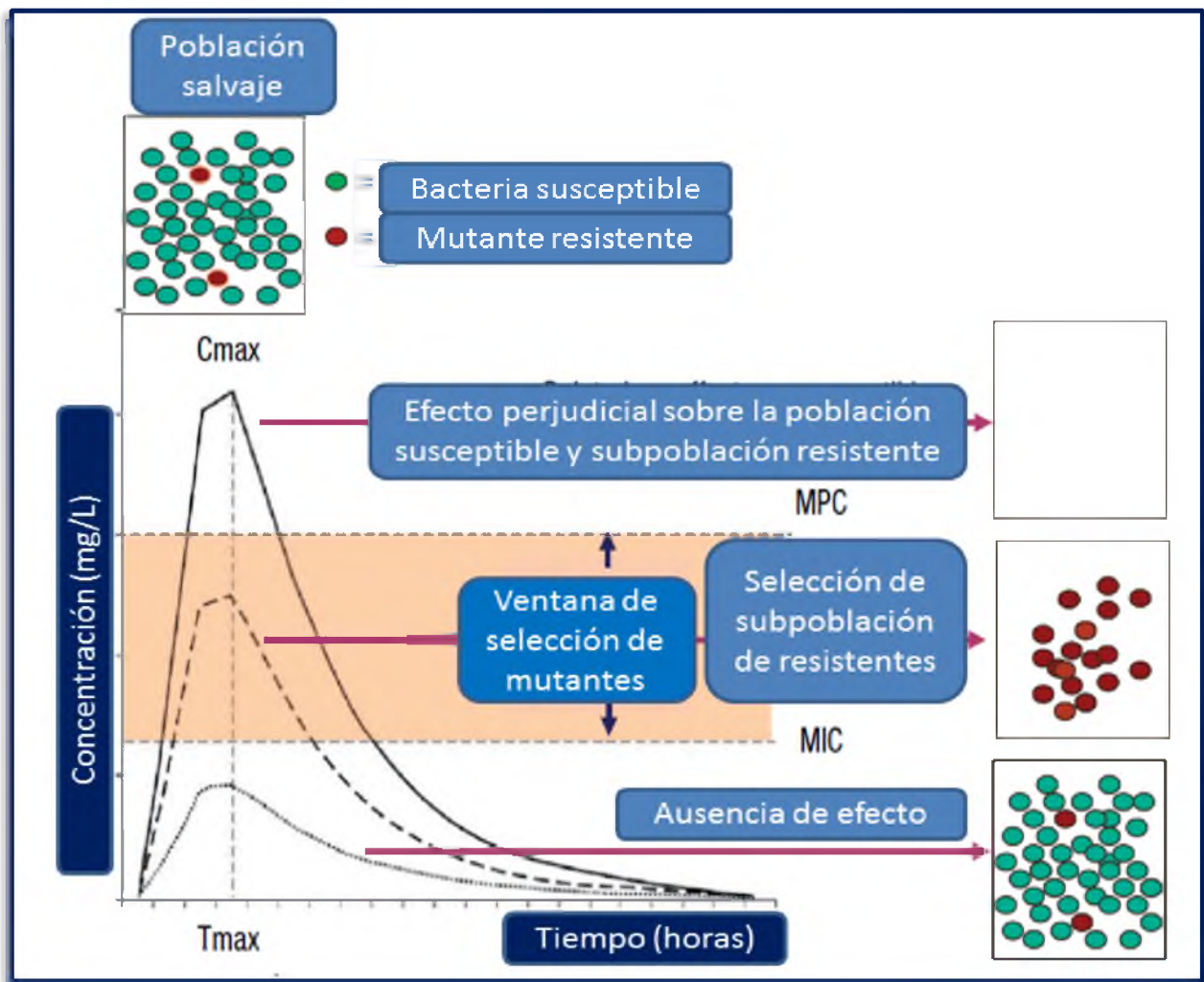


Figura 7. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración de prevención mutante (CPM) (Credito *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, se estudia el accionar *in vitro* de los ATMs para evaluar la reducción de la población total de bacterias en distintas infecciones *in vivo* de animales. Aunque todo ello aporta datos verídicos, a menudo ignora el impacto de la presión de las drogas en la amplificación de una subpoblación resistente. Así, tener en cuenta únicamente los índices farmacocinéticos / farmacodinámicos (PK / PD) apuntan a considerar solo el accionar bactericida de un ATM y no, su capacidad de favorecer en el tiempo la generación de cepas resistentes. Actualmente, a los índices PK / PD se los sustenta con otras consideraciones como el  $fAUC / CIM$  (Área bajo la curva de concentración - libre de plasma dividido por la CIM),  $el fC_{max} / CIM$  (concentración plasmática máxima de libre dividido por la CIM) y  $el fT_{CIM}$  (el tiempo en que las concentraciones libres están por encima de la CIM). Todos estos parámetros se expresan como



una función de la CIM, que si bien sigue siendo el parámetro farmacodinámico utilizado para describir la susceptibilidad de las poblaciones principales sensibles a un fármaco, permite también evaluar la concentración de prevención mutante (CPM) la cual se propone para valorar la susceptibilidad de las subpoblaciones resistentes. El conocimiento de ambos parámetros, CIM y CPM (figura 7) conlleva a definir los límites de la ventana de selección mutante (MSW), que es el rango de concentraciones de antibiótico que favorecería la generación de mutaciones necesarias para que la población se torne resistente (Ferran *et al.*, 2009; Kesteman *et al.*, 2009).

La aplicación de terapia antibiótica para controlar la mastitis ha sido muy eficaz. Sin embargo, aun cuando se pretende que las concentraciones de los ATMs disminuyan a niveles seguros antes de que la leche se recolecte para el consumo humano, con frecuencia se producen residuos en la leche de vacas tratadas. Esto podría conducir a la transferencia de genes de resistencia antibiótica tanto a la microbiota indígena intestinal como a patógenos potenciales, además de causar desórdenes de la flora intestinal y reacciones alérgicas (Cervantes-García *et al.*, 2014; Alós, 2015). La leche constituye una vía natural de eliminación para los antibióticos y sus metabolitos y la cantidad presente depende de la dosis, de la vía de aplicación, del nivel de producción de leche, del tipo y grado de afección mamaria y del tiempo que media entre el tratamiento y el ordeño. La aparición de residuos de medicamentos en la leche se debe generalmente a que no se respetan los tiempos de espera o se usan dosis excesivas. Entre los residuos de antibióticos más comunes en la leche se encuentran por ejemplo, las sulfonamidas y los nitrofuranos utilizados en el control de mastitis (Salas *et al.*, 2013).

Uno de los principales problemas para el control de la mastitis producida por *S. aureus* se relaciona con diferentes niveles de resistencia a los ATMs, particularmente a los betalactámicos (Song *et al.*, 2016). Dentro de los mecanismos por los que *S. aureus* ha adquirido resistencia a este grupo de ATMs se reporta la hiperproducción de betalactamasa, la modificación de las proteínas de unión a las penicilinas y la resistencia intrínseca a meticilina a partir de la incorporación a su genoma del gen *mecA*. Esta emergencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) actualmente constituye una alerta epidemiológica a nivel mundial (figura 8; Hamid *et al.*, 2017).

Los MRSA producen una proteína de unión a la penicilina denominada PBP2a codificada por el gen *mecA*; esta proteína mantiene la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división de las bacterias cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La transcripción del gen *mecA* es regulada por los genes *mecRI* que codifican para la

proteína de transducción de señal (MecR1), y *mecI* que codifica para la proteína represora de transcripción (MecI). Además, los genes *blaR1* y *blaI* reguladores del gen *blaZ* que codifica para la resistencia a la penicilina participan en la correulación de la transcripción del gen *mecA*. La transcripción del gen *mecA* se produce cuando la proteína MecR1 se expone a los  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a penicilina (PB), activando su dominio citoplásmico (MS) en forma de proteasa; a continuación se escinde la proteína represora MECI, la que bloquea la región operadora del gen *mecA* expresando la PBP2a. Los genes *mecR1* y *mecI* han sido identificados en *S. aureus* de origen humano y bovino (Cervantes-García *et al.*, 2014; López-Vázquez *et al.*, 2015).

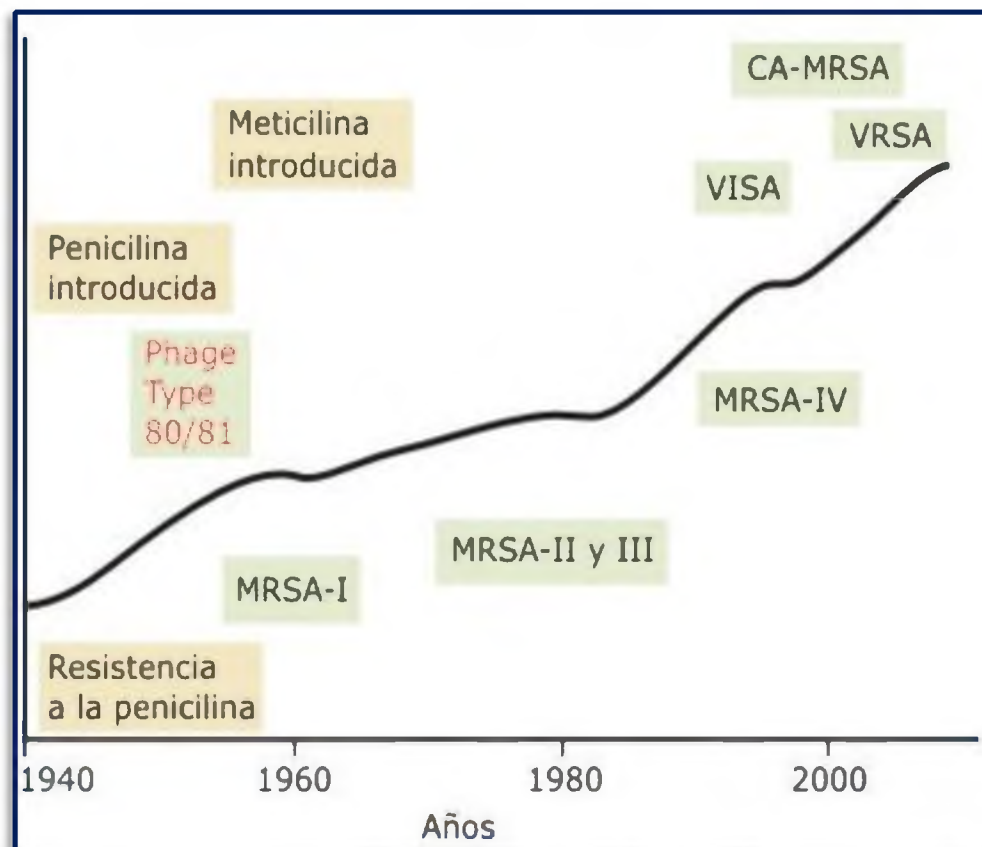


Figura 8. Incremento de la resistencia de *Staphylococcus aureus*.

En 1961 se consiguió el primer aislamiento de *S. aureus* resistente a la metilicina (MRSA) en Inglaterra. En 1963 sucedió el primer brote epidémico de MRSA nosocomial. En 1997 en Japón, la primera cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA o GISA) y en el año 2002 en Estados Unidos la primera cepa resistente a la vancomicina (VRSA).

MRSA: *S. aureus* resistente a metilicina. VISA: *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina. VRSA: *S. aureus* resistente a vancomicina. CA-MRSA: adquirida en la comunidad (Chambers & De Leo, 2009).

Distintas publicaciones dejan expuesto el aumento progresivo de cepas resistentes de *S. aureus* aisladas desde leche frente a ATMs utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011; Zschöck *et al.*, 2011; Giannechini *et al.*, 2014). La solución no es la generación de nuevos antibióticos que a corto plazo se tornarán ineficaces. Por lo aquí planteado, en lo inmediato se deberá reducir el uso de ATMs que solo será posible lograr mediante una mejor gestión y prácticas de higiene adecuadas y con una intervención activa por parte del estado como contralor, exigiendo cumplir una disminución en el uso indiscriminado de ATMs para el tratamiento, como se hizo en los países nórdicos europeos en 1980 (Ekman & Østerås, 2003). Además será necesario ensayar otras posibilidades terapéuticas para el control efectivo del problema, desarrollando terapias alternativas que controlen infecciones ocasionadas por *S. aureus*, en particular la mastitis bovina (Loeza Ángeles *et al.*, 2013; Tamariz *et al.*, 2014).

#### **II.4. Probióticos**

El término probiótico se refiere a microorganismos vivos, usados en forma de suplementos nutricionales, que mejoran el equilibrio microbiano en el intestino y tienen efectos beneficiosos sobre la salud (FAO / OMS, 2006). El uso de microorganismos es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antiguas que resulta en la transformación y preservación de los alimentos. La formación de diferentes metabolitos contribuye al sabor y textura característicos. Al mismo tiempo, se traduce en alimentos conservados y seguros con una vida útil extendida (Laulund *et al.*, 2017).

Los probióticos deben ser considerados ingredientes seguros para ser utilizados en los alimentos. El enfoque de lo considerado seguro pueden diferir de un país a otro. En la Unión Europea esto se establece en la Ley General de Alimentos. En Estados Unidos debe responder al estatus de GRAS (*General Regarded As Safe*) en el que a menudo no se establecen las mismas pautas que las que marca la Unión Europea (Laulund *et al.*, 2017). En la Argentina, el artículo 1.389 del Código Alimentario Argentino (CAA) contiene los parámetros de regulación de los probióticos. Allí establece que los alimentos elaborados con probióticos serán autorizados por una comisión evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la autoridad sanitaria o los que ésta designe a ese efecto para cada caso en particular (Código Alimentario Argentino, 2017).

La observación original de los efectos positivos de estas bacterias la hizo el científico ruso Ilya Metchnikoff (1907), quien señaló que el elevado consumo de yogur por parte de los pobladores de los Balcanes, tenía cierta asociación con su gran longevidad y buena salud física. Al mismo tiempo, el pediatra Henry Tissier (1907) observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bifidobacterias respecto de los niños sanos y sugirió que este tipo de bacterias podrían ser administradas a pacientes con diarrea para restaurar la flora original. El término probiótico fue utilizado por primera vez en el año 1965 por Lilly & Stillwell para describir a aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros microorganismos; sin embargo, fue a posterior cuando la palabra adquirió el significado que se le asigna actualmente, aludiendo a microorganismos incluidos en productos alimenticios que contribuyen al balance microbiano intestinal (Fuller, 1989).

En la actualidad para que un organismo sea considerado como probiótico debe reunir características como ser habitante normal del intestino humano, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de la bilis en el duodeno, tener capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad para aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas (Castro & De Rovetto, 2013; Berry *et al.*, 2017). Los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana y animal son cada vez más reconocidos y estudiados generando interés tanto en el ambiente científico, como en la industria alimenticia y farmacéutica (Carro *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2015; Del Coco, 2015; López & Marino, 2015; Sanchez *et al.*, 2015; García Hernández & Pérez Sánchez, 2015).

#### **II.4.1. Bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas**

Las BAL son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, de forma bacilar o cocoide. Comparten rasgos comunes como ser aerotolerantes, no patógenas, no toxigénicas, no forman esporas, no reducen el nitrato y no producen pigmentos (Sánchez & Tromps, 2014). Estas bacterias pueden ser homo o heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las BAL homofermentativas por glucólisis (Ruta de Embden-Meyerhoff) anaeróbica, en exceso de glucosa producen ácido láctico como único producto. Sin embargo, las BAL heterofermentativas utilizan la ruta metabólica de la pentosa fosfato (vía del fosfogluconato o lanzadera de fosfatos de pentosas) en la que la glucosa-6-fosfato es deshidrogenada a 6-fosfogluconato y luego descarboxilada para producir CO<sub>2</sub>. Luego la pentosa-5-fosfato es

disociada en fosfato de gliceraldehído y acetilfosfato. El fosfato de gliceraldehído se metaboliza en ácido láctico y el acetilfosfato se reduce a etanol a través de los intermediarios acetil-CoA y acetaldehído (GENMIC, 2007).

Tabla 4. Ejemplos de cepas probióticas más comúnmente utilizadas en productos alimenticios.

Cepa (designaciones alternativas)	Analizados como mezcla de cepas
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>L. casei</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> subesp. <i>lactis</i> Bb-12	
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>L. reuteri</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	RC-14
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	
<i>Bifidobacterium longum</i>	VSL#3 (mezcla de una cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus</i> spp., y tres cepas <i>Bifidobacterium</i> spp)
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431	
<i>Lactobacillus casei</i> F19	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>L. rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	R0011
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	<i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN y T
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii) lyo	

(Guarner *et al.*, 2011)

Este grupo de bacterias incluye géneros como *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* y *Pediococcus* (tabla 4) que pueden ser

aisladas a partir de alimentos fermentados, masas ácidas, bebidas, plantas, leche y los tractos respiratorio, intestinal y vaginal de animales de sangre caliente, entre otros (Zapata *et al.*, 2009; Bachmann *et al.*, 2017).

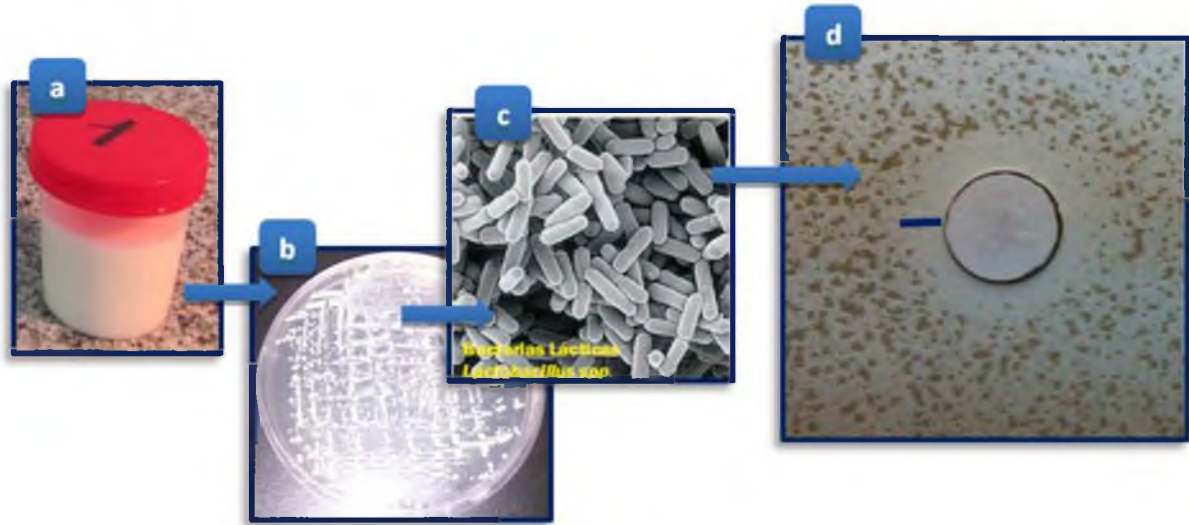


Figura 9. Inhibición del crecimiento bacteriano de extractos crudos de bacterias ácido lácticas (BAL).

a-Muestra de leche. b- Crecimiento de colonias de BAL. c- Imagen microscópica de las BAL. d- Inhibición del crecimiento de *S. aureus* alrededor del hoyuelo donde se inoculó extracto crudo de la BAL.

Debido a que las BAL poseen propiedades probióticas y bajo potencial patogénico, a que son parte de la microbiota normal de las mucosas y prevalecen en los alimentos fermentados, son consideradas organismos GRAS (*General Regarded As Safe*). Por todo lo expuesto, son utilizadas ampliamente en la preservación de alimentos (Sánchez & Tromps, 2014; Laulund *et al.*, 2017). Actualmente las BAL son utilizadas en la industria para preservar y aumentar la vida útil de los productos alimenticios y mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos como lo son el sabor, aroma, textura e incremento del valor nutricional. Esto es atribuible a la acción metabólica que ejercen sobre proteínas, azúcares y lípidos. La producción de metabolitos como el peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido cítrico, bacteriocinas, entre otros, deriva en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos ejerciendo un efecto antagónico por ejemplo frente a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. . Esto está demostrado con la obtención de resultados favorables en distintas evaluaciones del potencial bactericida de los extractos crudos de BAL sobre el crecimiento de microorganismos patógenos (figura 9) como los que se aíslan en ETAs (enfermedades de

transmisión alimentaria). Al disminuir la presencia de bacterias patógenas en los alimentos, se previenen toxoinfecciones e infecciones alimentarias y al impedir la adhesión de patógenos por exclusión competitiva, disminuyen su probabilidad de transmisión a través de alimentos (Fernández Villa *et al.*, 2014; Laulund *et al.*, 2017).

#### II.4.2. Aplicaciones de BAL o sus metabolitos liberados

Si bien se está aplicando la utilización de BAL o sus metabolitos en diversas áreas de las ciencias e industrias, aún falta dominar falencias en pos de mejorar sus aplicaciones. Por citar ejemplos, en la industria de la alimentación, se ha evaluado su capacidad para contribuir en la calidad y seguridad tanto de la malta como de los productos derivados aprovechando la existencia de BAL en la microbiota de los granos de cebada (Gerbardo *et al.*, 2012). El efecto antagónico de BAL aisladas a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente ha sido valorado frente *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. El género *Weissella*, así como sus metabolitos extracelulares han demostrado un gran potencial biotecnológico como bioprotectores de alimentos, antagonistas de actividad microbiana de cepas patógenas y alteradores de productos cárnicos, entre otros. Todo esto genera un potencial de utilización en la bioconservación de cepas BAL en alimentos artesanales elaborados en México (Alvarado Osuna, 2007). Dentro de lo desarrollado como productos probióticos para uso animal, se pueden citar ejemplos como la valoración de la capacidad inhibitoria sobre microorganismos patógenos de la cepa F2 de *Lactobacillus paracasei* subespecie *tolerans*, aislada de intestino de *Ramnogaster arcuata*, mostrando buenas perspectivas para su aplicación en el cultivo de trucha arcoíris, produciendo cambios significativos en la tasa específica de crecimiento y ganancia de peso promedio sin efectos negativos (Sica, 2015); el *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 fue probado como suplemento de la alimentación mejorando el rendimiento y la función inmune de lechones (Lähteinen, *et al.*, 2014).

En el plano farmacológico aplican tanto a medicina humana como veterinaria. Distintas investigaciones abordan las ventajas y desventajas de la administración sistemática de probióticos en la prevención de diarreas por diferentes causales como lo son la diarrea asociada al consumo antibióticos (Butler *et al.*, 2012), la asociada al *Clostridium difficile* en adultos y niños (Wiley & Sons, 2013), de la enterocolitis necrosante en neonatos prematuros (Alfaleh *et al.*, 2012), o en la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros (Suárez Rodríguez & Solís Sánchez, 2015). También se ha propuesto la selección de BAL resistentes a compuestos anticancerígenos para su futura administración a pacientes sometidos a quimioterapia. De hecho la cepa L43 podría ser utilizada en un futuro como probiótico para evitar que los enfermos de cáncer a los que se

administran afatinib, desarrollen mucositis, gestando una mejora de su calidad de vida. En el plano veterinario, las investigaciones están dirigidas fundamentalmente al tracto gastrointestinal (Delucchi, *et al.*, 2017). Microorganismos vivos con características probióticas son pensados como una alternativa al uso de antibióticos. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* se ha utilizado en cerdos junto con la ración de iniciación libre de antibióticos en fase de precebo, para el control de bacterias entéricas, influenciando las comunidades gastrointestinales y logrando un mejor control de las infecciones que causan diarrea (Ruiz-Moyano *et al.*, 2012). Delucchi, *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la cepa probiótica *Lactobacillus murinus* nativa (LbP2) sobre los parámetros clínicos generales de los perros con diarrea asociada al moquillo con efectos beneficiosos. En los ejemplos antes mencionado, se pueden ver el abordaje de los probióticos como eje central con características prometedoras en distintos ámbitos. Combinado con otras medidas terapéuticas, el tratamiento con probióticos parece ser prometedor. Sin embargo queda expuesta la necesidad de continuar las investigaciones a los fines de mejorar su utilización.

#### **II.4.3. Diseño de probióticos para uso en bovinos**

Uno de los parámetros a tener en cuenta en el diseño de un probiótico es el origen de las cepas. Serán convenientes aquellas que son aisladas del mismo ecosistema en el que se aplicarán contando así, con el apoyo de la especificidad del hospedador y del nicho ecológico (Sánchez *et al.*, 2015). Se entiende entonces que serán más efectivas cepas generadoras de probióticos de origen bovino contra otras cepas de especie bovina. Y más específicamente, si se piensa en cepas probióticas que sean potencialmente beneficiosas en la prevención de la mastitis, las BAL aisladas de la microbiota láctica autóctona de la ubre serán las que mejor apliquen a este parámetro sin que conlleven ningún tipo de riesgo para el animal. Espeche *et al.* (2009) adoptaron los siguientes criterios en el aislamiento de cepas BAL para ser utilizadas como probióticos en la prevención de mastitis:

- Las cepas no debían pertenecer al grupo de patógenos de mastitis.
- Buen estado de salud en los cuartos donde se realizó el aislamiento.
- Debían causar la inhibición de al menos uno de los patógenos probados.
- Poseer alta hidrofobicidad.
- Fenotipo de autoagregación.

Jurado-Gómez *et al.* (2015) siguiendo estos mismos parámetros demostraron inhibición de *L. casei* y su sobrenadante sobre las bacterias patógenas, mostrando buenas características



probióticas en condiciones *in vitro* que permitirían su aplicación en ensayos *in vivo* para el control de microorganismos causantes de mastitis subclínica en vacas. Por lo expuesto se puede observar que las líneas de investigación sobre el accionar de probióticos son abundantes generando un área potencial de aplicaciones tecnológicas que pudieran ofrecer alternativas valiosas en distintos campos de producción.

## **II.5. Péptidos antimicrobianos**

El uso inadecuado de los antibióticos crea condiciones favorables a la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes. Esto evidencia la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones que permitan sustituir a los ATMs convencionales, y es allí donde aparecen como posibilidad los PAs que son particularmente atractivos por sus pequeños tamaños, rápida acción y pocas posibilidades de desarrollar resistencia (Tonarelli & Simonetta, 2014; Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016; Starr, *et al.*, 2017).

Los PAs son polipéptidos (12 a 50 aminoácidos) codificados por genes y sintetizados en los ribosomas, que en algunos casos presentan aminoácidos modificados luego de la traducción. Actualmente se han descrito alrededor de 1.200 PAs. Se encuentran en casi todos los organismos vivos, ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal, y tienen la capacidad de destruir diferentes bacterias, hongos, parásitos y células cancerosas. La expresión de los PAs puede ser constitutiva o puede ser inducida en respuesta a estímulos infecciosos y/o inflamatorios, tales como bacterias o moléculas presentes en esas bacterias que inducen la inmunidad innata (Michea *et al.*, 2016). Los PAs son capaces de aumentar la fagocitosis, estimular la liberación de prostaglandinas, neutralizar los efectos de los lipopolisacáridos sépticos, promover el reclutamiento y la acumulación de diversas células inmunes en sitios inflamatorios, promover la angiogénesis e inducir la reparación de heridas. Son sustancias con complejos mecanismos de acción sobre el patógeno. Pueden actuar a través de su membrana o afectando blancos internos, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas. También pueden interactuar con el huésped a través de funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización. Es importante aclarar que aunque la generación de resistencia a los PAs es mucho menor si se compara con la provocada por los antibióticos convencionales, existen mecanismos de resistencia, como la degradación por proteasas, la liberación de proteínas inhibitoras o los cambios en la conformación de la membrana externa del patógeno. Están siendo analizadas sus aplicaciones farmacológicas considerando sus aspectos terapéuticos favorables.

También se investiga su potencial accionar en la biopreservación alimentaria, evaluándolos como sustitutos parciales o totales de los conservantes químicos. Dentro de los PAs producidos por bacterias han cobrado gran interés las bacteriocinas (Tellez & Castaño, 2010; Tonarelli & Simonetta, 2014).

### II.5.1. Bacteriocinas

Las BAL secretan pequeños péptidos bioactivos, simples o complejos, de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas, que ejercen su acción de modo extracelular y poseen actividad antimicrobiana como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismos. Su efectividad ha quedado demostrada contra cepas de *L. monocytogene*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. y *Clostridium* spp. (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2014; Londoño *et al.*, 2015; Ovchinnikov *et al.*, 2017). Tradicionalmente se han considerado como péptidos biológicamente activos con propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas desde el punto de vista taxonómico con la cepa productora, sin embargo, se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente (González-Martínez *et al.*, 2003). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Londoño *et al.*, 2015).

Las bacteriocinas son los metabolitos más estudiados como inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos en matrices alimentarias lo que redundaría en una reducción de las enfermedades transmitidas por alimentos. Poseen ciertas propiedades que los hacen particularmente atractivos, tales como su pequeño tamaño, rápida acción y pocas posibilidades de desarrollar resistencia. Son consideradas GRAS por la FDA (Food and Drug Administration, USA), no obstante, solamente algunos pocos péptidos han sido aprobados por esta entidad (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Tonarelli & Simonetta, 2014; Londoño *et al.*, 2015).

La primera bacteriocina aislada y aprobada para ser utilizada en alimentos fue la nisina (figura 10), producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, la cual comenzó siendo aplicada para controlar la proliferación de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos. En 1968 una comisión conjunta de la FAO y la OMS, aceptó su empleo y en 1983 se añadió a la lista positiva de aditivos del Consejo de la Unión Europea, confiriéndole el estatus de sustancia GRAS. Es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex

Alimentarius. El espectro de acción de la nisina incluye a potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos como son *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, entre otros. Sus propiedades físico-químicas la hacen resistente a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y su pequeño tamaño le permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los alimentos. Este conservante natural se emplea principalmente para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados, evitar la alteración de las conservas por microorganismos termófilos, y disminuir la intensidad del tratamiento térmico de alimentos enlatados (Londoño *et al.*, 2015). En la actualidad, las únicas bacteriocinas utilizadas comercialmente por tener licencia para su uso como bioconservantes son la nisina, producida por *Lactococcus lactis* (Nisaplin™; Danisco, Dinamarca), y la pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilactici* (ALTATM 2431; Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Irlanda). Otras bacteriocinas, como las lacticinas 3147 y 481, están a la espera de ser comercializadas (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Tonarelli & Simonetta, 2014). Se ha incrementado notablemente en los últimos años las investigaciones que apuntan no solo a clarificar su potencial benéfico sino también a desarrollar estrategias para identificar nuevos péptidos.

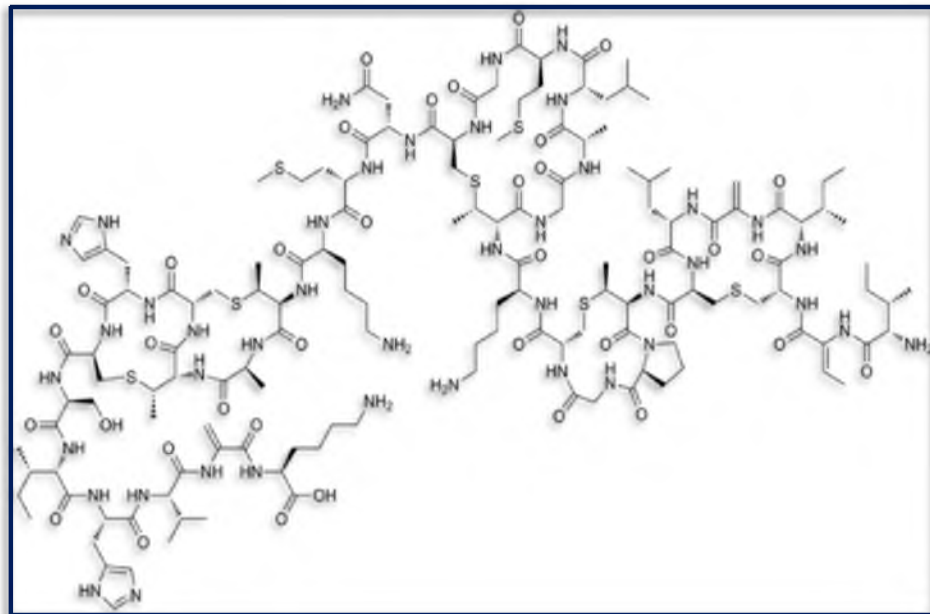


Figura 10. Estructura de la Nisina (Proteins Daily Blog., 2014).

### II.5.2. Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican de acuerdo con sus características químicas y espectros de actividad en cuatro clases:

- Clase I, conocidos como lantibióticos, son péptidos pequeños (menos de 5.000 Da), activos a nivel de membrana y termoestables. Los residuos de serina, treonina y cisteína en su propéptido experimentan modificaciones post-traduccionales extensivas para formar lantionina y metil-lantionina. Primero hay una formación del prepéptido, reacciones de modificación, clivaje proteolítico del péptido líder y translocación del prepéptido modificado o propéptido maduro a través de la membrana citoplasmática. Esta clase se subdivide a su vez, en lantibióticos tipo A y B, de acuerdo a sus estructuras químicas y a sus propiedades antimicrobianas. Ejemplos característicos de lantibióticos de tipo A son nisina (descubierta en el año 1928) y lacticina S y de tipo B, mersacidina y aconvenina.
- Clase II o no lantibióticos, son péptidos pequeños (menos de 10.000 Da), termoestables, que contienen aminoácidos regulares, corresponden a péptidos no modificados postraduccionalmente, son termoestables y presentan un rango de actividad bastante limitado. Son sintetizadas como prepéptidos que poseen una secuencia señal N-terminal y un sitio de procesamiento proteolítico doble glicina característico, que se encuentra en el extremo C-terminal del péptido señal. Luego de la formación del prepéptido, el péptido líder es removido concomitantemente a su exportación fuera de la célula a través del transportador ABC dedicado y su proteína accesoria. En este grupo se pueden identificar cuatro subclases:
  - Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, sus secuencias aminoacídicas muestran un elevado grado de homología (38 – 55 %), que es mucho más pronunciado en la parte N-terminal de los péptidos, la cual es altamente hidrofílica y catiónica. Todos los miembros de esta subclase tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
  - Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
  - Clase IIc.- péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder utilizando un sistema sec-dependiente, son procesadas y

secretadas a través de la vía secretoria general. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas enterocina P, divergicina A y acidocina B.

- Clase IId.- son las bacteriocinas de la clase II que, como sucede con la lactocina A, no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores. Algunos autores han sugerido la creación de otra subclase para las bacteriocinas que requieren cisteínas reducidas para su actividad, como la lactocina B.
- Clase III o bacteriolisinas, es a la que pertenecen proteínas con un peso superior a 30 kDa y sensibles al calor. No tienen demasiado interés industrial. En esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B.
- Clase IV, son de estructura compleja, están conformadas por un grupo heterogéneo de proteínas que presentan adiciones de carbohidratos y lípidos indispensables para su actividad biológica. A este grupo corresponden plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ.
- No clasificables: grupo integrado por aquellas que no se pueden clasificar en ninguna de las clases citadas, como por ejemplo la enterocina AS-48 (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Tonarelli & Simonetta, 2014).

### **II.5.3. Mecanismos de acción de las bacteriocinas**

Los mecanismos de acción de este tipo de sustancias son variados y están relacionados con complejas interacciones moleculares. Entre los mecanismos de acción reportados se destacan varias características esenciales para que puedan llevar a cabo su actividad antimicrobiana independiente del blanco celular, membrana o pared celular, así como la interacción con algunas proteínas importantes en el metabolismo de la célula. Aunque su carácter catiónico asociado con su tendencia a ser anfipáticas facilita su interacción e inserción en las paredes celulares aniónicas y membranas de fosfolípidos de los microorganismos se han propuesto varios mecanismos que explican su modo de acción, como: promover por sí mismo la captación, ejercer una acción detergente sobre la membrana celular y funcionar como poros de la membrana celular.

Las bacteriocinas poseen una carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas. La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de

interacción con la membrana. A pesar que estas características varían de molécula a molécula, todas son importantes para la actividad antimicrobiana.

Nisina en la clase I y pediocina como representante de la clase II comparten algunas características en común. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos. Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Aparentemente, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente y luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular. Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepcina se requiere de la unión a receptores membranales. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y la consecuente disipación del potencial de membrana. En la clase III, que son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción es menos complejo que el de los antibióticos y no antibióticos, ya que actúan directamente sobre la pared celular de las bacteria Gram positivas lo que conduce a la lisis y muerte de las células (Télles & Castaño, 2010; Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Tonarelli & Simonetta, 2014).

#### II.5.4. Resistencia de las bacteriocinas

Su mecanismo de acción y su espectro de inhibición relativamente cerrado, hace poco frecuente la aparición de cepas resistentes (Aguilar & Klotz, 2011). Sin embargo, aun cuando se presenta como un fenómeno menor hay que decir que las bacteriocinas han mostrado resistencia. Si bien es generada con mayor dificultad comparado con los antibióticos convencionales, es importante tener en cuenta que las connotaciones de resistencia en este tipo de sustancia, en cuanto a la generación de resistencia cruzada con los péptidos utilizados por el sistema inmune, pueden ser más graves (Roces *et al.*, 2012; Kristiansen *et al.*, 2016; Ghequire *et al.*, 2017).

Actualmente se conoce que la resistencia de las bacterias a los PAs está determinada por propiedades de la bacteria que incluyen carga y estructura de los componentes de la membrana externa, como lipopolisacáridos, composición de los lípidos y presencia de un potencial electroquímico en la membrana citoplasmática, y la respuesta de la bacteria a cambios ambientales y estrés, así como mecanismos de transporte, flujo y degradación del péptido. Para el caso de algunas bacterias se ha podido comprobar la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar los PAs; algunos ejemplos son elastasas, gelatinasas, metaloproteinasas, metaloproteasas, proteasas de cisteína y de superficie, en diferentes organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* Otro mecanismo de resistencia es la neutralización de los PAs a través de la unión de moléculas unidas a la membrana o secretadas por ella, o por inducción de moléculas del huésped que se unan a los PAs. También es aplicable como mecanismo de resistencia, la existencia de algunos transportadores transmembrana capaces de bombear los PAs junto con algunos antibióticos convencionales, lo que favorece a una resistencia contra múltiples sustancias (Téllez & Castaño, 2010; Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Kristiansen *et al.*, 2016; Ghequire *et al.*, 2017).

Aun cuando la utilización de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas como preservantes naturales en alimentos motiva a su utilización y se han realizado avances en los conocimientos sobre mecanismos de acción, estructura, síntesis y caracterización molecular de estas sustancias, el surgimiento de cepas resistentes a bacteriocinas hace necesario la ampliación de los estudios hacia ese campo.

### II.5.5. Avances y aplicaciones en la industria de la alimentación

Actualmente, las bacteriocinas son utilizadas en una amplia categoría de alimentos, incluyendo cárnicos, lácteos, productos enlatados, vegetales y bebidas como cerveza y vino. Sus características de compatibilidad en dichos productos, así como su modo de acción, hacen atractivo su uso en los alimentos. Las bacteriocinas más utilizadas para inhibir microorganismos patógenos en diversas matrices son nisina, leucocina, pediocina y enterocina, aunque en menor proporción se aplican otras.

Según los distintos estudios analizados se puede ver que la actividad de la bacteriocina se evalúa a través de preparaciones parcialmente purificadas obtenidas desde caldos de cultivo, obteniéndose en la mayoría de los casos una baja concentración de bacteriocinas, que limita la eficacia de la biopreservación y su aplicación a nivel industrial. La producción de ciertas bacteriocinas por métodos de laboratorio no implican su efectividad en los alimentos, pero la acción combinada de una o más bacteriocinas con otros metabolitos como reuterina, glicina, ácido láctico y antimicrobianos de uso industrial pueden reforzar considerablemente la acción inhibitoria, mejorando los efectos bactericidas. En la mayoría de los estudios se evalúa la inhibición de las bacteriocinas *in vitro* y no directamente sobre el alimento. Es común la utilización de placas de agar que contienen cantidades conocidas de microorganismo patógeno en las cuales se inoculan preparados que contienen bacteriocinas, se incuban y se determinan las inhibiciones del crecimiento del patógeno según los tamaños de los halos de no crecimiento en milímetros. No obstante se comprueba la existencia de una gran variabilidad en cuanto a los diseños y condiciones de experimentación (condiciones de almacenamiento, temperatura, técnica, etc.) a la hora de evaluar el efecto inhibitorio de las bacteriocinas (Mondragón Preciado *et al.*, 2013; Fernández Villa *et al.*, 2014). Todas las técnicas confluyen en su fin último, que es la reducción de las poblaciones de patógenos en comparación con un control, tratando de emular las condiciones en las cuales será utilizada a posterior. Es categórico tener en cuenta que la aplicación directa de bacteriocinas puede resultar en la disminución o pérdida de la actividad antimicrobiana debido a la posible interacción con componentes de los alimentos, siendo esto posible de ser mejorado relativamente, utilizando diseños donde la bacteriocina sea combinada con otros antimicrobianos. Esto sugiere que la eficacia de las bacteriocinas es mayor *in vitro*, frente a su uso directo en los alimentos y que el efecto inhibitorio de las bacteriocinas depende del tipo de bacteriocina, de la matriz alimentaria, de las condiciones del experimento y del microorganismo a inhibir. Como factores desfavorables para utilizar bacteriocinas en alimentos,



son los costos en cuanto a la producción, su poca termotolerancia y su espectro antibacterial, lo cual varía dependiendo de la bacteriocina. Un elevado número de investigaciones resaltan a *L. monocytogenes* y *S. aureus* como los microorganismos más estudiados en pruebas de inhibición de su crecimiento en alimentos a través del uso de bacteriocinas (Fernández Villa *et al.*, 2014; Londoño *et al.*, 2015).

El desafío planteado en la actualidad tiene que ver con mejorar la conservación de los alimentos frescos disminuyendo el uso de preservantes químicos debido a los efectos adversos que puedan causar en la salud del consumidor; para lo cual, la búsqueda de alternativas al uso de ATMs o las búsquedas apuntadas a otras potencialidades, ha suscitado la exploración de las capacidades de las bacteriocinas. A pesar del contexto expuesto, los estudios sobre los metabolitos generados por BAL con actividad contra patógenos, los principales agentes microbianos contra los cuales se han empleado y el tipo de alimentos que con mayor frecuencia se han investigado, siguen siendo exiguos y los estudios individuales no permiten disponer de un perfil completo sobre estos tópicos ni presentan conclusiones con buena potencia estadística o validez externa, de modo que puedan ser aplicados en múltiples contextos (Monteagudo-Mera *et al.*, 2011; Fernández Villa *et al.*, 2014).

#### **II.5.6. Potencialidades farmacológicas de las bacteriocinas**

Dentro de las potencialidades que se pueden valorar de las bacteriocinas se cuenta con:

- Espectro de actividad: Bacterias, hongos, virus y algunos tumores.
- Poseen un objetivo relativamente no específico o múltiples objetivos.
- Generalmente para producir resistencia se requieren múltiples pases sub CIM o de la presencia de proteasas específicas. Es inferior a la que produce los ATMs convencionales.
- Incluyen mecanismos anti-endotóxicos y de incremento en la respuesta inmune innata.
- Poseen una vida media corta por degradación proteolítica.
- No se conocen toxicidades por su uso tópico.
- Son agentes inmunomoduladores.

Como factores desfavorables de las bacteriocinas se cuentan los siguientes:

- Tienen un elevado costo de producción.
- Los posibles efectos colaterales de este tipo de sustancias (por ejemplo, se ha encontrado actividad embriotóxica y paralizante sobre los espermatozoides).

Actualmente las bacteriocinas están siendo evaluadas como monoterapia, para la prevención y tratamiento de infecciones humanas (Álvarez-Calatayud *et al.*, 2015) y veterinarias (Rodrigues De Oliveira *et al.*, 2015; Jurado-Gámez *et al.*, 2015), en combinación con los ATMs convencionales, con el fin de promover un efecto sinérgico o aditivo a estos últimos (Justiniano Mejía & Mejía Delgado, 2013) o en combinación con otras bacteriocinas (Tonarelli & Simonetta, 2014); como agentes inmunomoduladores que incrementen la inmunidad innata natural y en función de sus propiedades quimiotácticas (Prieto Peña *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2015), como agentes neutralizantes de las endotoxinas (Téllez & Castaño, 2010) y con el fin de prevenir complicaciones fatales asociadas con los factores de virulencia que causan el choque séptico (Tonarelli & Simonetta, 2014).

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

En respuesta a los objetivos específicos planteados en esta tesis, este capítulo se presenta dividido en tres ejes principales. En el primero de ellos (ítem III.1), se encuentran los contenidos relacionados a las muestras y el procesamiento de las mismas para estimar la prevalencia de mastitis, así como el análisis de los factores de riesgo de infecciones intramamarias (IIM) producidas por *S. aureus*, en vacas en período de lactancia procedentes de los tambos localizados en el Departamento Río Segundo, Córdoba.

El segundo eje (ítem III.2), plantea los materiales y métodos para abordar al tercer y cuarto objetivo específico, abarcando la detección, caracterización, purificación y secuenciamiento de los PAs; como así también el aislamiento e identificación de las BAL productoras de dichos péptidos.

Por último, el tercer eje (ítem III.3) abarca al segundo y cuarto objetivo a través del análisis de concentraciones inhibitorias mínimas de los ATMs y de los PAs individualmente y la comparación entre ellas.

### III.1. Mastitis bovina en el Departamento Río Segundo (Córdoba)

#### III.1.1. Animales intervinientes en el muestreo

La población objeto de análisis para estimar la prevalencia de mastitis bovina fue la correspondiente a las vacas en lactancia procedentes de los tambos radicados en el departamento Río Segundo, Córdoba. Los datos referidos a la cantidad de vacas en lactancia ( $N = 12.370$ , anexo VIII.1) así como el número de tambos (141) y su distribución espacial, fueron aportados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) regional, a través del Ente Departamental de Salud Animal (SENASA / EDeSA, 2012).

El número de animales a muestrear en toda la extensión departamental ( $n$ ) fue obtenido según las recomendaciones de Mateu & Casal (2003) y Scheaffer *et al.* (2005), para estimar

proporciones en poblaciones finitas. Para el cálculo fueron considerados el total de animales en lactancia en Río Segundo (N), la proporción de éxitos (p) con un valor del 50 % (debido a la ausencia de datos relacionados a la frecuencia de mastitis en la región), un máximo error de estimación (e) del 5 % y una confianza del 95 %.

La selección de los individuos dentro de cada establecimiento fue realizada en forma aleatoria en la medida que ingresaban a la sala de ordeño. Como factores de inclusión se consideraron que los animales estén clínicamente sanos (exceptuando los casos de mastitis clínica), cursando entre la segunda y quinta lactancia y en el segundo tercio del período de lactancia.

Por otra parte, los tambos que participaron del muestreo fueron seleccionados en forma sistematizada, considerando uno de cada cuatro tambos de los 141 en existencia en el departamento Río Segundo (anexo VIII.2).

### **III.1.2. Caracterización de los establecimientos**

Una encuesta semi-estructurada fue aplicada como instrumento de recolección de datos, que sirvió para caracterizar los establecimientos muestreados. Además de obtener información referidos a la composición del rodeo (vacas en ordeño y producción diaria), en la consulta se abordaron aquellos factores del tambo que probablemente estarían relacionados con la presentación de mastitis (Vissio *et al.*, 2012; Vissio *et al.*, 2015), tales como los métodos de control que se emplean, el seguimiento de la mastitis y otras características inherentes al personal y equipo de ordeño (cuando el mismo no fuera manual). Como se puede observar en la tabla 5, todos los factores se presentaron de manera categórica, de acuerdo a la hipótesis de bajo o alto riesgo de presentación de mastitis (asignándose como puntaje 0 o 1, respectivamente). Cabe destacar que los datos de la tabla 5 considerados en el apartado animales (cantidad de vacas en lactación y producción de leche), surgieron del supuesto que los establecimientos con mayor número de animales, apuestan a una mejor producción, la que se consigue a través de la optimización del manejo higiénico-sanitario del rodeo (puntuación 0 para  $\geq 100$  y 1 para  $< 100$ ; Olszewski, 2016). Si se tiene en cuenta que la infección por *S. aureus* generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de toda la vida del animal, la presencia de animales enfermos aumentaría las posibilidades de transmisión de la enfermedad a otros animales del rodeo (Pereyra *et al.*, 2014). Debido a esto se consideraron en el apartado manejo y

seguimiento como factores de riesgo la presencia de vacas con mastitis clínica al momento del muestreo y el no apartar vacas con mastitis clínica en los últimos 6 meses.

La sumatoria de las puntuaciones de los distintos factores de riesgo (tabla 5) permitió categorizar a los establecimientos en muy buenos (0 a 4 puntos), buenos (5 a 9 puntos), regulares (10 a 14 puntos) y precarios (15 a 19 puntos). A través de un test de ANOVA (previa corroboración de normalidad y homocedasticidad) con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se pudo analizar la diferencia de las medias de producción de leche diaria por animal entre las distintas categorías de tambo; el nivel de significación fue del 5 % ( $p < 0,05$ ).

Tabla 5. Datos considerados en la encuesta semiestructurada para la caracterización de los tambos.

<b>Animales</b>		<b>Puntaje</b>
<b>Cantidad de vacas en lactación</b>	$\geq 100$	0
	$< 100$	1
<b>Producción de leche (l/vaca/d)</b>	$> 20$	0
	$\leq 20$	1
<b>Manejo y seguimiento de la mastitis</b>		
<b>Responsable en el control de mastitis</b>	Médico Veterinario	0
	Otros <sup>1</sup>	1
<b>RCS<sup>2</sup> en leche de tanque</b>	$< 200.000$	0
	$\geq 200.000$	1
<b>Personal con capacitación técnica para tareas relacionadas al ordeño</b>	Si	0
	No	1
<b>Realiza control lechero</b>	Si	0
	No	1
<b>Orden en que hacen ingresar a la sala de ordeño los animales sanos y con mastitis</b>	Primero los sanos, luego los enfermos	0
	En cualquier orden	1
<b>Presencia de vacas con mastitis clínica al momento del muestreo</b>	No	0
	Si	1
<b>Realiza prueba de los primeros chorros</b>	Si	0
	No	1

Tabla 5 (continuación)

<b>Manejo y seguimiento de la mastitis</b>		
<b>Uso de CMT<sup>3</sup> para mastitis subclínica</b>	Si	0
	No	1
<b>Remite al laboratorio muestras sospechosas de mastitis</b>	Si	0
	No	1
<b>Emplea guantes en la manipulación de las ubres durante el ordeño</b>	Si	0
	No	1
<b>Realiza sellado de pezones post-ordeño</b>	Si	0
	No	1
<b>Aparta vacas con mastitis clínica (últimos 6 meses)</b>	Si	0
	No	1
<b>Selección de medicamentos para el tratamiento de mastitis</b>	Por indicación del Med. Veterinario	0
	Otros <sup>1</sup>	1
<b>Equipo de ordeño</b>		
<b>Tipo de ordeño</b>	Mecánico	0
	Manual	1
<b>Frecuencia en los controles de la máquina de ordeño (mantenimiento del equipamiento)</b>	≤ 3 meses	0
	> 3 meses	1
<b>Tiempo de cambio de pezoneras</b>	Según indicación de fabricante	0
	Cuando se gastan	1
<b>Emplea tanques de almacenamiento refrigerados para el producto</b>	Si	0
	No	1

<sup>1</sup>Cualquier otra persona que no sea médico veterinario. <sup>2</sup>RCS: recuento de células somáticas. <sup>3</sup>CMT: California Mastitis Test.

### III.1.3. Examen clínico de la glándula mamaria y toma de muestras de leche

Una vez en la sala de ordeño, cada vaca fue explorada clínicamente en forma general y luego la glándula mamaria en forma particular. Esta maniobra fue llevada cabo por profesionales médicos veterinarios, docentes de la Universidad Nacional de Villa María.

La exploración clínica consistió en los procedimientos semiológicos habituales, constando fundamentalmente de la inspección y palpación general de la ubre y luego en

particular, considerando cada cuarto mamario (Mora *et al.*, 2015). Se tuvo en cuenta la forma de la ubre y de cada cuarto, la simetría de los cuartos mamarios, el estado de la piel y ganglios, así como la forma, consistencia y sensibilidad de los pezones (Guía de Semiología veterinaria, UBA, 2014). En esta instancia, el animal podía registrarse como positivo a la mastitis clínica, si uno o más cuartos mamarios poseía algún signo compatible con la inflamación (para casos agudos: tumefacción, rubor, dolor al tacto y aumento de la temperatura respecto a otro cuarto mamario; o bien fibrosis, induraciones o atrofia del cuarto, en los casos crónicos). Luego se procedió a la exploración de la secreción láctea de cada cuarto mamario, bajo un fondo oscuro. Si existían grumos o alteraciones en su coloración normal o aspecto (ej. sanguinolento, acuoso, purulento) en al menos uno de sus cuartos mamarios, también se consideraba al animal como positivo a la mastitis clínica.

Cabe destacar que conjuntamente con el procedimiento de inspección de la leche, se tomaba una muestra destinada a bacteriología (de acuerdo a recomendaciones de Oliver *et al.*, 2004) y al RCS. La muestra de leche se consideraba para la glándula mamaria en su conjunto, es decir que estaba constituida como mezcla de la procedente de los cuatro cuartos mamarios.

En tal sentido, previamente a la extracción de la leche, se procedía a realizar la higiene y la antisepsia de la piel de los pezones. Primero se limpiaban los pezones con toallas de papel desechables para retirar la suciedad común, se desinfectaba el pezón con solución iodada y se realizaba la antisepsia de la punta del pezón con algodón embebido en alcohol al 70 % v/v. Luego de dejar secar el alcohol, se eliminaban los primeros tres a cinco chorros de leche de cada cuarto, los que se examinaban clínicamente para registrar probables alteraciones, como se mencionó anteriormente. Seguidamente se recolectaban, en frasco estéril, entre 10 a 15 ml de leche de cada cuarto mamario. Los frascos se cerraban herméticamente, y una vez rotulados se conservaban en una caja isotérmica con geles refrigerantes hasta su remisión inmediata y durante el transporte al Laboratorio de Microbiología, de la carrera de Medicina Veterinaria del Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Villa María.

En este último lugar y en condiciones de esterilidad, fueron fraccionados aproximadamente 10 ml de leche en tubos estériles, los cuales se destinaron para los aislamientos bacterianos (*S. aureus* y BAL). A los 40 ml de leche restantes se les agregó 150 µl de azidiol para conservar y evitar que se aglutinen las células somáticas, debido a que esta muestra se destinó al RCS. Todas las muestras fueron mantenidas en refrigeración (4 °C) en un período inferior a las 10 h hasta su análisis.

### III.1.4. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* y recuento de células somáticas

Tal cual lo ilustra la figura 11, las muestras de leche se sembraron en medio cromógeno selectivo (CHROMagar, Francia), para el aislamiento y diferenciación directa de *S. aureus*, durante 24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica. A partir de las placas que evidenciaron crecimiento de colonias de color rosado (aspecto típico que adopta *S. aureus* en este medio; sensibilidad superior al 99 %), se recuperaron colonias puras, que luego fueron subcultivadas en agar cerebro corazón (BHI, Brain Heart Infusion mas agar bacteriológico al x %), (Biokar diagnostics, Francia), incubándose durante 24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica.

Se realizaron las pruebas de catalasa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% p/v y coagulasa en tubo con plasma fresco de conejo. Aquellas muestras que resultaron positivas (+) para ambas pruebas fueron almacenadas a -20 °C por duplicado, en 0,8 ml de caldo triptena soya (Britania, Argentina) más 0,2 ml de glicerol como crioprotector.

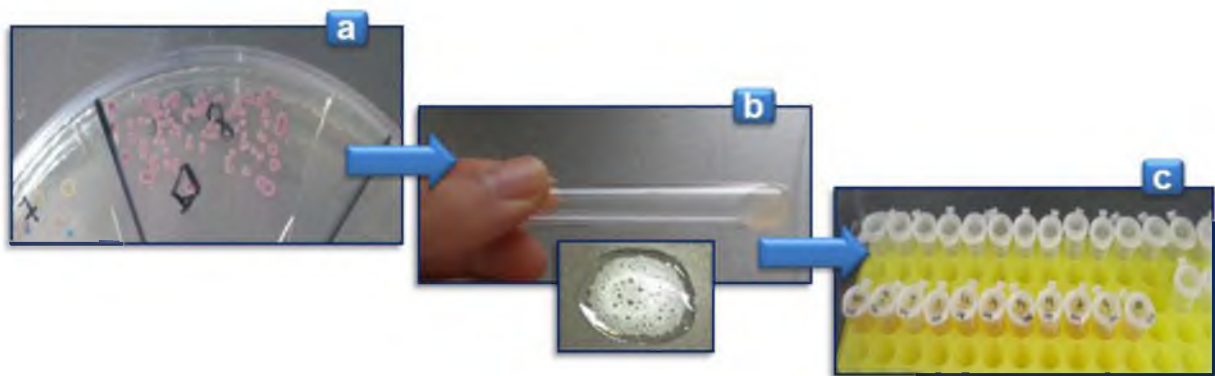


Figura 11. Proceso de aislamiento de las cepas de *S. aureus*.

(a) Cultivo en medio cromógeno selectivo para el aislamiento y diferenciación directa de *S. aureus*. (b) Prueba de catalasa y coagulasa. (c) Almacenamiento.

Por otra parte, a las muestras de leche conservadas con azidol se las remitió al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Villa María (Labvima Sh) para que se les efectúe el RCS. En tal laboratorio, se empleó citometría laser en contador Somacount 300 (SIEM srl, Italia) según ISO 13366 – 2 : 2006 / IFD – 148 - 2 : 2006. Este instrumento utiliza el colorante bromuro de etidio (Bio Basic inc, Canadá) para teñir el ADN de las células, que por sus características de fluorescencia, cada célula detectada, genera una emisión de luz roja cuando se lo expone a luz verde, que son captadas por un sistema óptico automático y puesta de manifiesto por pulsos eléctricos que se cuentan y ordenan por tamaño, mostrándose los resultados en la pantalla. Se estimó la media con su intervalo de confianza del 95 %.



La interpretación de los RCS se tuvo en cuenta según recomendaciones de Berry (2014), estableciéndose como punto de corte a las 200.000 cél /ml. Si las muestras de leche poseían valores superiores o iguales a este valor, se consideraba al individuo con una elevada probabilidad de presentar mastitis.

### III.1.5. Estimación de la prevalencia de mastitis

La mastitis se consideró para la glándula mamaria en conjunto. Vale decir que si el caso en cuestión se registraba en al menos uno de los cuatro cuartos mamarios de la vaca, era suficiente para catalogar a un animal con mastitis (Reneau, 1986).

Los casos de mastitis se tuvieron en cuenta para las categorías que se detallan en la tabla 6, de acuerdo a la evidencia clínica de inflamación, la presencia o ausencia de aislamientos de *S. aureus* y los RCS en la leche. Se observa en dicha tabla que no sólo se contemplaron los casos clínicos y subclínicos de mastitis producidos por *S. aureus* (IIM por *S. aureus*), sino también aquellos casos de mastitis clínica inespecífica, independientemente de la producida por dicho agente.

Tabla 6. Interpretación de resultados para la estimación de la prevalencia de mastitis, tras la exploración clínica de la glándula mamaria bovina, la bacteriología de la leche (ausencia o presencia de *S. aureus*) y el recuento de células somáticas (RCS) en la leche.

Clasificación del caso	Signos clínicos*	Leche	
		Aislamiento de <i>S. aureus</i>	RCS (cél/ml)
<b>Sano</b>	Ausentes	Negativo	< 200.000
<b>Mastitis clínica a <i>S. aureus</i></b>	Presentes	Positivo	≥ 200.000
<b>Mastitis clínica inespecífica</b>	Presentes	Negativo	≥ 200.000
<b>Mastitis subclínica a <i>S. aureus</i></b>	Ausentes	Positivo	≥ 200.000
<b>Indefinida</b>	Ausentes	Negativo	≥ 200.000

\* Signos compatibles con inflamación mamaria.

La clasificación “indefinida” fue aplicada para aquellos casos donde sólo existían RCS ≥ 200.000 cél/ml. Este único criterio no fue suficiente para catalogar a un animal con mastitis

subclínica, debido a que existen factores fisiológicos, que pueden incrementar normalmente el RCS por encima de las 200.000 cél/ml (además del calostro, final de la lactancia y número de lactancias que se consideraron en la selección de los animales, se citan a la etapa del celo, los ordeños realizados por la tarde respecto de los de la mañana y los de verano respecto a los de invierno; Hernández Reyes & Bedolla Cedeño, 2008).

La prevalencia de mastitis fue expresada en forma bruta, para las vacas en lactancia de todos los tambos que participaron del muestreo, y en forma específica, considerando las categorías asignadas a los establecimientos según lo especificado bajo el título “III.1.2. Caracterización de los establecimientos”. El momento del registro de los casos de mastitis, corresponde al momento del muestreo, que se llevó a cabo entre los meses de mayo a setiembre del año 2012.

### **III.1.6. Análisis de los factores de riesgo asociados a la presencia de mastitis**

Inicialmente se analizó la asociación entre la presencia IIM por *S. aureus* y las categorías de tambos. Se consideró a la categoría “precarios” como el grupo de mayor exposición a la instalación y/o persistencia de mastitis por *S. aureus*, y a las otras tres categorías en conjunto como el grupo de menor exposición. Como medida de asociación se utilizó a la razón de prevalencia entre ambos grupos y como medida de impacto potencial a la prevalencia atribuible para el grupo expuesto. Para dichas asociaciones se empleó Chi-cuadrado, test exacto de Fisher y T-student; el nivel de significancia utilizado fue de 0,05.

Por otra parte, fue analizada la existencia de asociación entre cada uno de los factores de riesgo hipotéticos (variables independientes o explicativas relacionadas al manejo y equipo de ordeño) con la presencia de IIM producidas por *S. aureus* (variable dependiente o respuesta con dos posibles valores: “0” y “1” indicando la ausencia o presencia de la IIM, respectivamente).

De acuerdo a ello, en una primera etapa se evaluó la asociación mediante el cálculo del *odds ratio* (OR) con su intervalo de confianza (95%), y su significancia ( $p < 0,05$ ) empleando la prueba Chi cuadrado. Aquellas variables que resultaron asociadas significativamente, fueron evaluadas en segunda instancia por regresión logística mediante un modelo de efectos mixtos lineales generalizados con distribución binomial ( $p < 0,05$ ) (García & Díaz, 2011; Papp *et al.*, 2017). En este modelo, la variable “tambo muestreado” fue la intercepción aleatoria. Este análisis fue contemplado debido a que cada variable hipotética de riesgo considerada, está relacionada a

las características de la unidad productiva, pudiendo afectar en forma similar a los animales de un mismo tambo, pero no necesariamente a los procedentes de diferentes tambos.

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa informático SPSS Statistics 22, IBM.

## **III.2. Péptidos antimicrobianos**

### **III.2.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas y elaboración de los extractos libres de células**

Para la búsqueda y aislamiento de BAL se seleccionaron en forma aleatoria sistemática una de cada tres muestras de leche del total recolectadas. Estas se sembraron en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Biokar Diagnostics, Francia), incubándose a 37 °C durante 72 h en anaerobiosis.

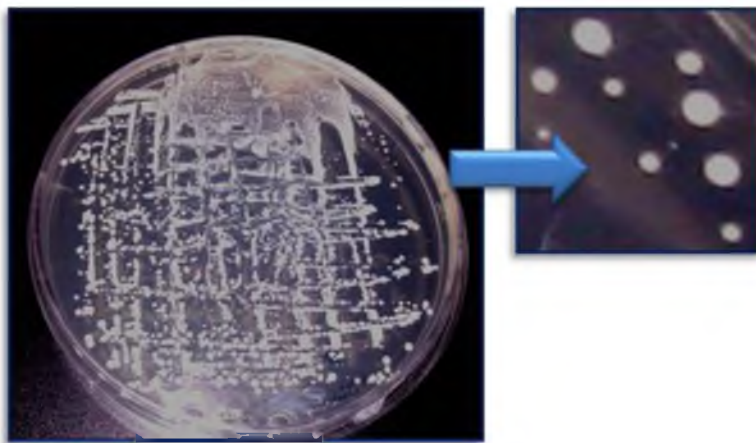


Figura 12. Cultivo de bacterias ácido lácticas típicas

Las colonias de características morfológicas de borde neto, cremosas y blancas (figura 12), fueron cultivadas en 9 ml de caldo MRS (Biokar Diagnostics, Francia) e incubadas en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24 h. Fueron conservados aquellos cultivos con pH entre 4 y 5, catalasas negativos (prueba de catalasa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % p/v) y Gram positivos. Se centrifugaron 15 min a 3.100 xg y se extrajeron 1,5 ml de cada sobrenadante para ser nuevamente centrifugados 15 min a 10.000 xg. Estos últimos sobrenadantes, filtrados con acetato plus-blanca

0,22  $\mu\text{m}$  (Filtros Gamafil, Argentina), se rotularon como “extracto libre de células sin neutralizar” (ELCSN).

El resto de sobrenadante de los cultivos seleccionados fue ajustado a pH 6-6,5 con hidróxido de sodio 5 M, para luego ser llevados 30 min a 70 °C (útil para quitar proteasas del medio que pueden inactivar los PAs). A continuación se extrajeron 1,5 ml y se centrifugaron 15 min a 10.000 xg. Sus sobrenadantes, previo filtrado con acetato plus-blanca, 0,22  $\mu\text{m}$  (Filtros Gamafil, Argentina) fueron rotulados como “extracto libre de células neutralizado” (ELCN).

Las cepas de BAL y sus correspondientes ELCSN y ELSN fueron conservadas a -20 °C por duplicado.

### **III.2.2. Valoración de la actividad antibacteriana de las sustancias inhibitorias presentes en los extractos libres de células**

Mediante la técnica microbiológica de difusión en agar (Bennett *et al.*, 1966; Bhunia *et al.*, 1988; Schillinger *et al.*, 1991) se evaluó la actividad antimicrobiana de las sustancias inhibitorias presentes en los ELCSN y ELCN frente a los aislamientos de *S. aureus* provenientes de las vacas intervinientes en el muestreo, empleándose como referencia a la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron incubadas *over night* en caldo cerebro corazón (BHI: brain heart infusión; Biokar Diagnostic, Francia) para luego ser ajustadas con densitómetro (Densimat – Biomerieux, Francia) a la escala 0,5 de McFarland, la cual equivale a una concentración de  $10^8$  UFC/ml (Zamora Rodríguez, 2003). Se inocularon 40  $\mu\text{l}$  por cada 15 ml de agar blando cerebro corazón al 0,8 % de agar - agar (Britania, Argentina), mantenidos en baño térmico a 50 °C. Cada mezcla fue homogeneizada y dispensada en placas de Petri estériles. Una vez solidificada, se realizaron hoyos con sacabocado estéril (5 mm de diámetro), en los que se colocaron 30  $\mu\text{l}$  de cada extracto libre de células (ELC) a analizar, y a la bacteriocina nisina (N5764 – 1G de *Lactococcus lactis*, Sigma, USA) como control positivo de referencia. Después de dejar reposar las placas durante 1 h a 4 °C para permitir que los ELC difundiesen en el medio, se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el período de incubación, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento bacteriano, los que fueron medidos con calibre digital (Electronic Digital Calliper Stronger 0 - 150 mm, China). Tal como se observa en la figura 13, la medida considerada fue la distancia existente entre el borde del hoyuelo y el borde externo del halo (Schillinger & Lucke, 1987). Los resultados fueron expresados en milímetros.

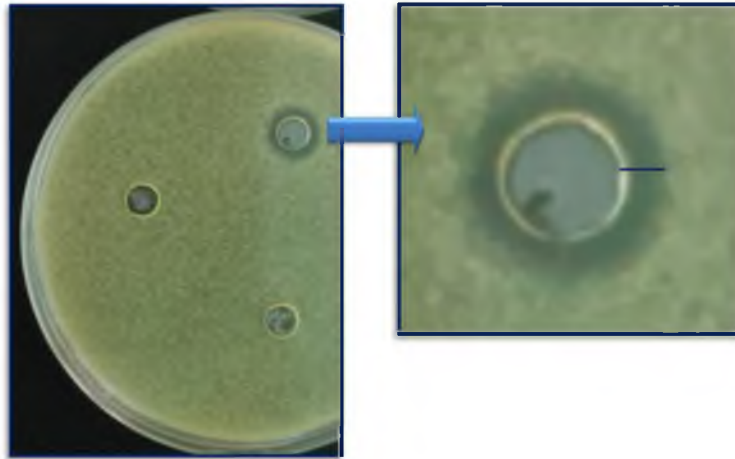


Figura 13. Longitud considerada en la medida de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Se calcularon las medidas de resumen estadística (media, desviación estándar, valores mínimos y máximos, y mediana) de las mediciones de los halos generados por los ELC en sus formas “sin neutralizar” y “neutralizados” por separado.

Debido a que los halos también pueden ser producto de la presencia en las muestras de sustancias no proteicas como por ejemplo ácidos, que inhiben el desarrollo de *S. aureus*, se aplicó la prueba estadística T para muestras apareadas ( $p < 0,05$ ). Esto tuvo el fin de analizar si existían diferencias significativas entre las mediciones de los halos de ELCSN y ELCN de cada aislamiento en particular, siendo:

$$H_0 \mu_{\text{diferencial}} = 0 \quad H_1 \mu_{\text{diferencial}} \neq 0$$

De aquellos pares de extractos que demostraron ambos actividad antimicrobiana, se seleccionaron sólo los ELCN (neutralizados) para continuar con las experimentaciones posteriores.

### III.2.3. Caracterización de las sustancias inhibitorias: tratamiento con proteinasa K y valoración de la termoestabilidad a distintos pH

Para confirmar la naturaleza proteica de las sustancias antibacterianas presentes en los ELCN del experimento anterior, fueron tratadas alícuotas de estos extractos con enzima proteinasa K (Promega, USA), en concentraciones finales de 0,5 mg/ml y 1 mg/ml de la enzima, utilizándose como controles negativos, muestras sin proteinasa (Schanzenbach, 2005). Siguiendo

la técnica aplicada por Ramírez-Romero *et al.* (2013) las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 90 min. Posteriormente, y con el fin de inactivar la enzima, se adicionó etilenglicol-bis (2 - aminoetiléter) -N, N, N 'ácido, N' - tetra acético (EGTA, Sigma - Aldrich, Inc, USA) pH 8, en una concentración 2 mM y se calentó a 60 °C durante 10 min. La actividad antimicrobiana de las muestras fue evaluada según la técnica microbiológica de difusión en agar, descrita en el apartado previo (III.2.2.). Cuando había pérdida de la actividad antimicrobiana luego del tratamiento enzimático, se consideró que dicha actividad era producida por al menos un péptido antimicrobiano presente en la muestra. En lo sucesivo, solo se continuó experimentando con las muestras que perdieron la actividad ante el tratamiento enzimático.

Los PAs fueron evaluados según su termoestabilidad a distintos valores de pH (Schanzenbach, 2005). De aquellas BAL cuyos ELCN tuvieron una pérdida de la actividad inhibitoria luego del tratamiento con proteinasa K se elaboraron cultivos *over night* en caldo MRS. Se centrifugaron a 3.100 xg durante 20 min y se tomaron los sobrenadantes. Estos se fraccionaron en 5 alícuotas que se ajustaron a valores de pH 4 a 8. Cada una de estas fracciones, a su vez se las subdividió en tres alícuotas menores que fueron sometidas a los siguientes tratamientos térmicos: 95 °C / 15 min, 121 °C / 15 min y control sin calentamiento. Finalmente se enfriaron a temperatura ambiente, se ajustaron a pH 6 y se valoraron sus actividades antimicrobianas según la técnica descrita en el apartado III.2.2.

#### **III.2.4. Purificación de los péptidos antimicrobianos**

Los PAs de cada aislamiento seleccionado fueron purificados partiendo de cultivos *over night* de BAL en caldo MRS aplicando el método de adsorción-desorción descrito por Yang *et al.* (1992), con modificaciones. Con el fin de eliminar proteasas que pudiesen estar presentes en los cultivos, se calentaron a 70 °C durante 30 min y luego se les ajustó el pH a 5 con una solución 6 N de hidróxido de sodio. Por agitación moderada durante 4 h a 4 °C se favoreció, la adsorción de los PAs a las membranas celulares de las bacterias productoras. Se centrifugaron a 3.100 xg durante 20 min, descartándose los sobrenadantes y reteniendo los precipitados celulares que fueron dos veces lavados con buffer fosfato (5 mM fosfato de sodio, pH 6) y resuspendidos en una solución 100 mM de NaCl, pH 1. Mediante agitación a 4 °C durante 10 h, se benefició la desorción de los PAs desde las membranas para luego ser centrifugadas a 3.100 xg durante 20 min, descartándose los precipitados celulares y reteniendo los sobrenadantes con los PAs, cuyos pH se ajustaron a 6,5 con hidróxido de sodio, 6 N.

A los fines de concentrar y eliminar los posibles interferentes presentes (sales y otras moléculas pequeñas) los sobrenadantes post adsorción-desorción fueron sometidos a diálisis. Se utilizaron membranas semipermeables de 3.500 Daltons de peso molecular de corte o MWCO (SnakeSkin Dialysis Tubing - Thermo Scientific - USA) contra una solución de bicarbonato de amonio (Anedra Research AG S.A., Argentina) a punta de espátula, pH 7 en agua ultrapura. Por constituir un buffer volátil disminuyó la probabilidad de generar nuevos interferentes. Este proceso se sostuvo durante 24 h a 4 °C en agitación moderada con dos recambios del buffer. Una vez concluido el dializado, se procedió a una liofilización de las muestras (equipo liofilizador Martin Christ ALPHA 1-4 LD; Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral), obteniéndose en polvo el contenido proteico.

### **III.2.5. Electroforesis**

En un procedimiento posterior, los productos liofilizados fueron solubilizados con buffer fosfato (5 mM fosfato de sodio, pH 6) y sometidos a electroforesis, aplicando la técnica SDS - PAGE en cuba Mini Protean Tetra System (Bio - Rad, USA). Esta técnica permitió determinar parcialmente la variedad de proteínas presentes en cada muestra. Como control de electroforesis se utilizó un marcador de proteínas entre 260 kDa y 3,5 kDa (Novex Sharp Standard, by Life Technologys, USA) y las condiciones para la electroforesis fueron las siguientes: 100 V durante 40 min y 150 V hasta el final del ensayo.

Para cada muestra se utilizaron 2 geles de acrilamida al 16 % con el esquema de electroforesis de la figura 14. Uno de ellos se utilizó para evaluar la concentración del PA (gel 1) y el otro para la secuenciación del PA por espectrometría de masa (gel 2), en un paso ulterior. Para detectar la ubicación del PA en estudio en la electroforesis, sirvió de referencia una porción de cada gel en la que también se sembró la misma muestra (calle 2) y a la que se le realizó la prueba de inhibición del crecimiento microbiano.

El rango de concentraciones de albúmina (100, 200, 400 y 800 µg/ml, expresadas como a, b, c y d, respectivamente) que se utilizaron como referencia para realizar el cálculo de concentraciones de los PAs en las muestras surgió a partir del dosaje previo de las proteínas totales de las muestras por el método de Bradford (técnica sensible que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante, Coomassie Blue G - 250, cuando éste se une a las proteínas, absorbiendo así a 595 nm; Bradford, 1976).

La siembra fue de 25  $\mu$ l tanto para las muestras como para el marcador de proteínas y de 10  $\mu$ l para las soluciones de albúmina.

Gel 1; objetivo: evaluar la concentración del péptido antimicrobiano.

Calles									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Muestra	PrM	Muestra		a	b	c	D	

Gel 2; objetivo: evaluar la secuenciación amioacídica del péptido antimicrobiano.

Calles									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Muestra		PrM		Muestra				

Figura 14. Esquema de corrida de electroforesis SDS-PAGE.

Referencias: Muestra (liofilizada y luego resuspendida en PBS), PrM (marcador de proteínas), a (solución de albúmina 100  $\mu$ g/ml), b (solución de albúmina 200  $\mu$ g/ml), c (solución de albúmina 400  $\mu$ g/ml), d (solución de albúmina 800  $\mu$ g/ml).

Al finalizar la electroforesis fue cortada la calle 2 en ambos geles, las que fueron fijadas durante 2 h en una solución de propanol: ácido acético: agua (20: 10: 70), y luego lavadas en agua destilada estéril durante 3 h, con cambios frecuentes. Utilizando como referencia el marcador de proteínas, se cortaron trozos del gel que pudiesen contener bandas con potencial inhibitorio de interés en un rango lo suficientemente amplio para evitar pérdidas por defecto (desde los 15 kDa hasta la parte baja del gel fraccionado en 5 trozos de gel). En una placa de Petri fueron colocados los trozos de gel para ser cubiertos por 15 ml de agar blando BHI al 0,8 % de agar-agar inoculado con *S. aureus* 29213, tal cual se describe en el apartado III.2.2 (*vide supra*). Estas placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y luego examinadas para identificar la banda que mostraba zona de inhibición del crecimiento bacteriano a su alrededor.

El resto del gel 1 fue fijado y teñido durante 4 h con una solución al 1 % de Coomassie Blue R 250 en metanol y ácido acético (35: 65) y posteriormente lavado con metanol y ácido acético (35: 65), quedando así visibles las bandas presentes en la muestra y las de las distintas concentraciones de albúmina, necesarias para el cálculo de concentración de proteína de la banda de interés a través del programa ImageJ (*vide infra* apartado III.3.2). El resto del gel 2 fue cubierto por solución fijadora (etanol: ácido fosfórico: agua, proporción 30: 2: 68) durante 3 h.



Luego fue lavado 3 veces durante 30 min con agua destilada. El gel fue inmerso en solución de tñido (0,5 g/l Coomassie Blue G - 250 disuelto en una solución de metanol al 18 % v/v, sulfato de amonio al 17 % p/v y ácido fosfórico al 2 %) y posteriormente lavado con metanol, agua y ácido acético (35: 63: 2) quedando visibilizadas las bandas presentes en la muestra. La banda coincidente con la que generó halo de inhibición (muestra corrida en calles 2) fue seleccionada con el objeto de realizarle posteriormente la secuenciación del PA por espectrometría de masa (*vide infra* apartado III.2.6).

### III.2.6. Secuenciación de aminoácidos

De cada gel 2 se cortaron las bandas con potencial antimicrobiano (entre 3,5 kDa y 15 kDa) y se enviaron al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM, Argentina) para su estudio mediante espectrometría de masa (Jiménez Martínez, J. 2015; Olvera-García, *et al.*, 2015). Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 min a 56 °C y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM durante 45 min en oscuridad. Luego se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg). A los digeridos con tripsina se les realizó una limpieza con Zip - Tip C18 para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y vueltas a resuspender con 10 µl de Ácido Fórmico 0,1 %. Se analizó por nano HPLC (cromatógrafo Thermo Scientific, modelo EASY - nLC 1000; apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa, Thermo Scientific, modelo EASY - Spray Accucore, P/N ES801) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap (Thermo Scientific, modelo Q - Exactive; celda de HCD, High Collision Dissociation, y un analizador Orbitrap), lo que permitió en primer lugar una separación de los PAs obtenidos por digestión triptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La configuración del equipo permitió que la identificación de los PAs se realizase al mismo tiempo que los mismos se separaban por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. La ionización de las muestras se realizó por electrospray (Thermo Scientific, EASY - SPRAY) y el análisis de los datos obtenidos se consiguió a través del programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific, versión 1.4).

Las secuencias de los PAs identificados se introdujeron a la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para realizar una comparación de “secuencias cortas de alta coincidencia” (*short, nearly sequences*) y determinar si existía similitud con secuencias de bacteriocinas reportadas anteriormente (Sahoo *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017).

### III.2.7. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias de las bacterias ácido lácticas productoras de los péptidos antimicrobianos

Las identificaciones genotípicas de los aislamientos con número de muestra 81, 59, 90 y 108 se consiguieron mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr (Fukao *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016). La región de interés se amplificó, a partir del ADN templado, empleando los oligonucleótidos universales 27f (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') y 1492r (5' -TACGGYTACCTTGTTACGA CTT - 3'). La mezcla de reacción de PCR se realizó según se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR.

Componente	Volumen en $\mu$ l
ADN templado	4
Solución de amplificación (10X)	10
dNTPs (10 mM)	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6
Oligonucleótido sentido (10 mM)	4
Oligonucleótido antisentido (10 mM)	4
Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,6
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Hasta volumen final de 100

Las muestras fueron procesadas en termociclador (Bio-Rad, USA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (1 min a 94 °C), hibridación (1 min a 55 °C) y extensión (2 min a 72 °C) más un ciclo final de 10 min a 72 °C y 4 °C.

Mediante electroforesis en gel de agarosa se resolvieron las bandas, los productos de PCR fueron precipitados y purificados mediante el sistema comercial DNA Clean and Concentrator<sup>TM</sup> - 5 (Zymo Research, Estados Unidos) según las especificaciones del fabricante. Luego fueron enviados para su secuenciación al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Argentina). Los electroferogramas obtenidos, fueron procesados y analizados manualmente con el software BioEdit Sequence Alignment Editor para obtener las secuencias completas (1300 - 1500 pb) del gen 16S ARNr. Se analizaron las secuencias del gen 16S ARNr,

con el objetivo de determinar el género y la especie más cercana en cada caso, empleando la base de datos Basic Local Alingment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **III.3. Perfiles de susceptibilidad / resistencia de antibióticos y péptidos antimicrobianos**

#### **III.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos**

El perfil de sensibilidad / resistencia para ATMs de uso frecuente en producción lechera regional (ampicilina, cloxacilina, tilosina, oxitetraciclina, penicilina y gentamicina) fue evaluado frente a las cepas aisladas de *S. aureus* mediante la prueba cuantitativa de dilución en agar, según recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, USA (CLSI, 2013).

Se valoró la actividad de cada fármaco ATM, en el rango de concentración comprendido entre 0,008 y 32 µg/ml, acorde a lo planteado por Saini *et al* (2011) y Ruiz *et al* (2016). Inicialmente se elaboró una solución stock de 3200 µg/ml, pesando 160 mg de cada fármaco ATM (droga pura, corregida por potencia), disueltos en una cantidad mínima de agua bidestilada (o etanol 95 % para el caso de tilosina) hasta obtener una solución verdadera, y llevados a un volumen final de 50 ml con agua bidestilada. Cada solución stock fue fraccionada en crioviales de 5 ml, mantenidas a -20 °C y utilizadas por única vez, una vez descongeladas.

La solución stock de cada ATM (3200 µg/ml) se diluyó en agua (en proporción 1:10) y de esta se realizaron diluciones seriadas (1:2), de modo de obtener 13 soluciones madres con concentraciones comprendidas entre 320 y 0,08 µg/ml. La concentración final a valorar se obtuvo en el medio de cultivo, vertiendo 5 ml de cada solución madre en 45 ml de agar Muller-Hinton estéril (Britania, Argentina) templado (47 °C) en baño termostático. El medio de cultivo con su correspondiente dilución y tipo de ATM, finalmente se homogeneizó y dispensó en placas de Petri de 10 mm de diámetro (por duplicado; 20 ml/placa).

Por otra parte, para elaborar los inóculos, se sembraron las cepas de *S. aureus* en 5 ml de caldo tripteína soja (Britania, Argentina), incubándose 24 h a 37 °C. Desde estos cultivos se tomaron alícuotas que se ajustaron con agua estéril hasta alcanzar una turbidez compatible con el patrón 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/ml; medida con densitómetro Densimat, Biomerieux, Francia). Inmediatamente luego, cada cepa fue rediluida hasta alcanzar una concentración de  $10^7$  UFC/ml.

Con el uso de un multi-inoculador de Steers - Foltz (Argentina) se inocularon las cepas en las distintas placas con diluciones de ATM, por duplicado. Asimismo en cada placa se inoculó como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, y solución fisiológica estéril como control negativo. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. La concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento bacteriano fue informada como la CIM para cada ATM probado.

### **III.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los péptidos antimicrobianos**

Según se comentó en (III.2.5) uno de los objetivos de la electroforesis, fue la de estimar la concentración de los PAs presentes en las bandas proteicas del gel 1. Para ello, estas bandas fueron escaneadas digitalmente, las imágenes obtenidas se guardaron como formato TIFF y se procesaron *in silico* mediante el programa ImageJ. Este software libre y con código abierto permite la automatización de procesos de manera simple mediante la programación de macros y pluggins, siendo su principio básico la repetibilidad (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.; Schneider *et al.*, 2012). Las intensidades de las bandas fueron analizadas según la metodología propuesta para análisis de geles de la guía del usuario de ImageJ / Fiji 1,46 (ImageJ, 2012). La variable de respuesta que se determinó fue la densidad relativa de las bandas, que es directamente proporcional a las concentraciones de las muestras (Faggio *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Farci *et al.*, 2016; Veglia *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Adamiak *et al.*, 2017).

Debido a que los valores calculados por ImageJ son esencialmente números arbitrarios, que sólo son válidos en el contexto exclusivo de la imagen del gel seleccionada, fue necesario expresar las densidades de las bandas seleccionadas con relación a un estándar de concentraciones conocidas. Es por esto que en cada gel, conjuntamente a las muestras, se procesaron también cuatro soluciones de albúmina (100, 200, 400, 800 µg/ml) previa cuantificación por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Una vez conocida la concentración de cada PAs a través del uso del programa ImageJ, se elaboraron diluciones de cada uno en los rangos que a continuación se indican:

- PA 59: entre 20,700 a 0,040 µg/ml.
- PA 81: entre 4,100 a 0,016 µg/ml.
- PA 90: entre 30,900 a 0,060 µg/ml.
- PA 108: entre 28,900 a 0,056 µg/ml.

Las CIM de los PAs se determinaron aplicando la misma metodología que para los ATMs la cual fue expuesta en el apartado III.3.1.

### **III.3.3. Análisis de las concentraciones inhibitorias mínimas de antibióticos y péptidos antimicrobianos**

Los resultados obtenidos en los puntos III.3.1 y III.3.2 fueron expresados en forma absoluta y en porcentaje de inhibición, realizándose gráficas donde se observó la distribución de las cepas inhibidas para las CIM. Posteriormente se comparó la distribución de la CIM de cada ATM con los puntos de corte propuestos por CLSI (2013) y EUCAST (2015).

Al comprobarse que los PAs no alcanzaron el 50 % y 90 % de inhibición del crecimiento de *S. aureus*, se consideró el porcentaje de inhibición conseguido al menos por todos los PAs (35 %). Debido a esto se calcularon las CIM<sub>35</sub>, tanto para los PAs como los ATMs.

Tal como se puede ver en el anexo VIII.10, las CIM de los PAs se estimaron en rangos de diluciones particulares para cada uno de ellos, y a su vez distintos del rango de dilución utilizado para los ATMs (32 a 0,008 µg/ml). Debido a esto, la comparación de los resultados obtenidos de frecuencia relativa acumulada porcentual (FRA %) se hizo teniendo en cuenta las diluciones aproximadamente similares entre los ATMs con las de los PAs.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### IV.1. Mastitis bovina en el Departamento Río Segundo (Córdoba)

#### IV.1.1. Animales y tambos intervinientes en el muestreo

El tamaño de muestra obtenido fue de 372 vacas en lactancia para todo el departamento Río Segundo. Sin embargo, se incrementó un 5 % ( $n= 390$ ) para compensar probables pérdidas de las muestras o contaminación de las mismas. Todos los animales intervinientes en el muestreo provenían de 38 tambos, teniendo en cuenta la existencia de 141 tambos en la zona, y la selección sistematizada de los mismos (figura 15).

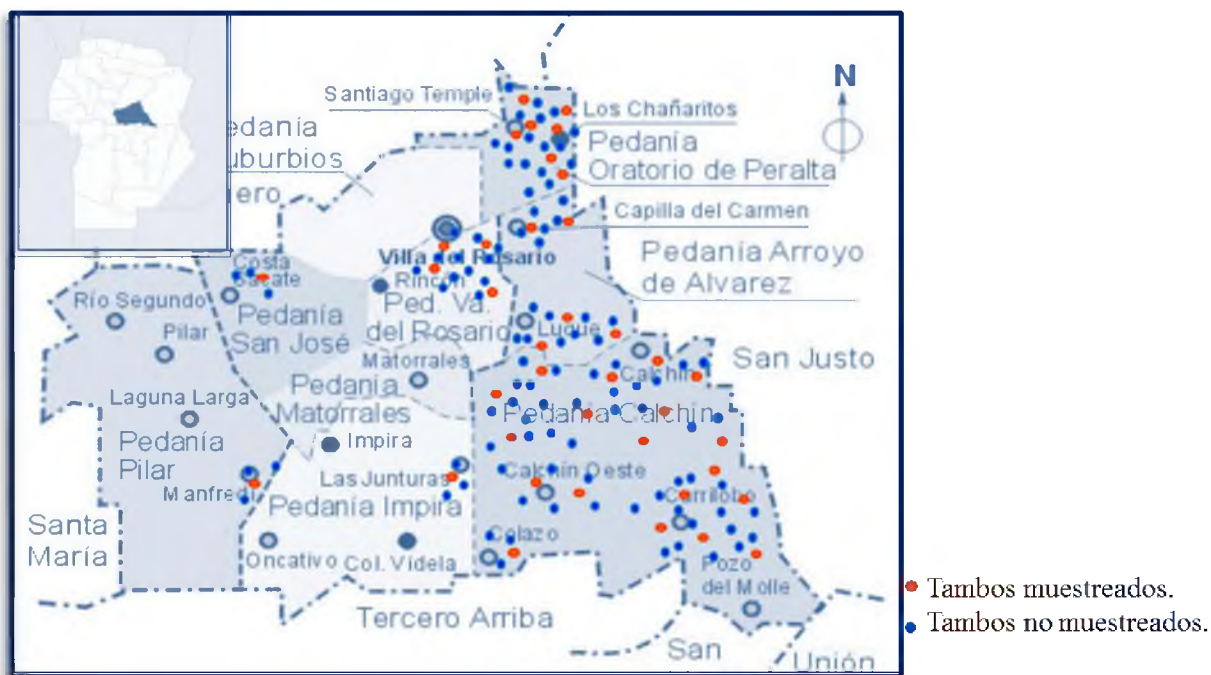


Figura 15. Distribución de los tambos seleccionados para el muestreo del departamento Río Segundo, Córdoba (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Provincia de Córdoba, 2015).

Los tambos pudieron ser categorizados a partir de los datos aportados por la encuesta y la sumatoria de puntos establecidos en la tala 5. Se contabilizaron 3 tambos clasificados como precarios, 13 como regulares, 13 como buenos y 9 como muy buenos. Con 902 vacas en lactancia, los tambos precarios producían  $14,7 \pm 2,0$  litros de leche por animal y día (l / animal / d), en tanto que las categorías de tambos regulares, buenos y muy buenos lograban producciones de  $17,3 \pm 1,4$ ;  $23,0 \pm 1,6$  y  $29,1 \pm 2,4$  l / animal / d, con un total de 2.721, 2.876 y 1.385 vacas en lactancia, respectivamente. Según estos datos, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la producción de leche diaria por animal, entre cada categoría de tambo (figura 16, anexo VIII.3).

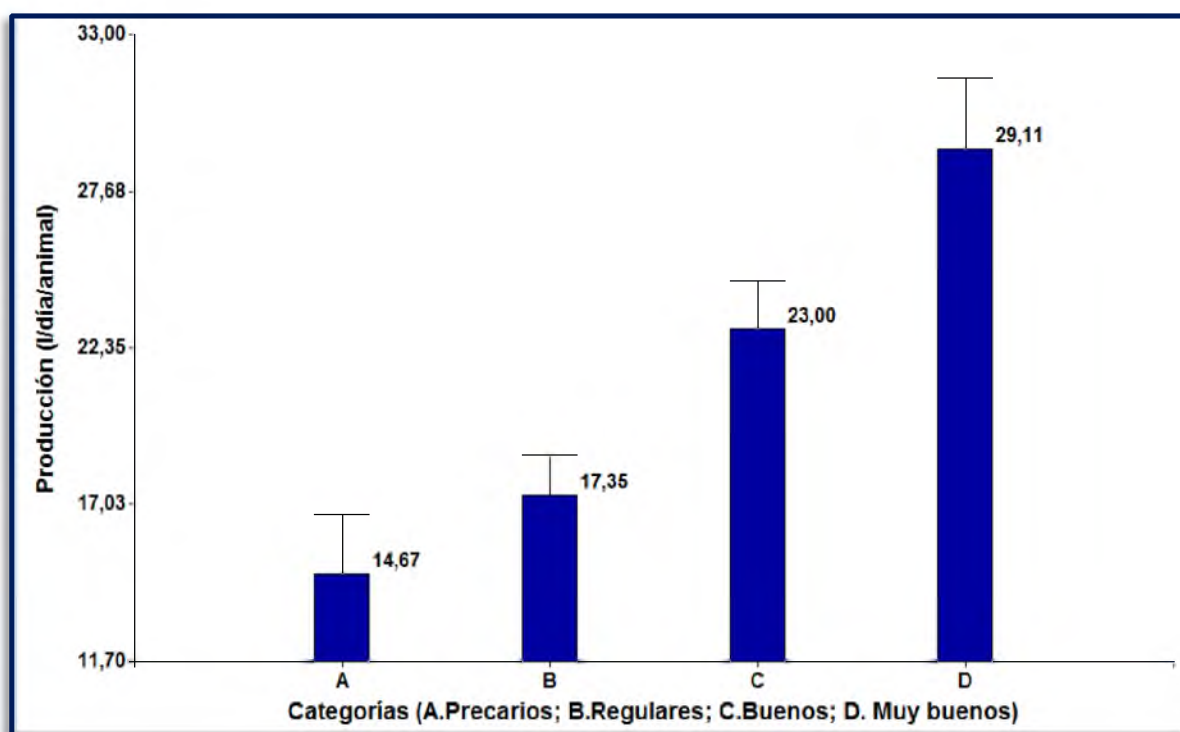


Figura 16. Producción diaria de leche por animal, para las diferentes categorías de tambos, intervalo de confianza del 95 %. Existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la producción entre cada categoría de tambos.

#### IV.1.2. Análisis descriptivo y prevalencia de mastitis.

Tras la visita a los establecimientos se pudo establecer que el 5,9 % de las vacas muestreadas demostraron evidencias clínicas de mastitis en al menos uno de los cuartos. De las muestras de leche se aisló un 11,8 % de *S. aureus* de las cuales todas poseían RCS superiores al

punto de corte de 200.000 cél/ml. Independientemente de la presencia o ausencia de *S. aureus* en leche, un 63 % de las muestras resultaron con  $RCS \geq 200.000$  cél/ml (anexo VIII.4).

De acuerdo a los parámetros clínicos, los aislamientos de *S. aureus* y los RCS (tabla 6) se registró que 227 vacas estaban sanas (58,2 %), 16 presentaban mastitis clínica por *S. aureus* (4,1 %), 7 mastitis clínica inespecífica (1,8 %), 30 mastitis subclínica por *S. aureus* (7,7 %) y 110 correspondían a la categoría indefinida (28,2 %) (figura 17).

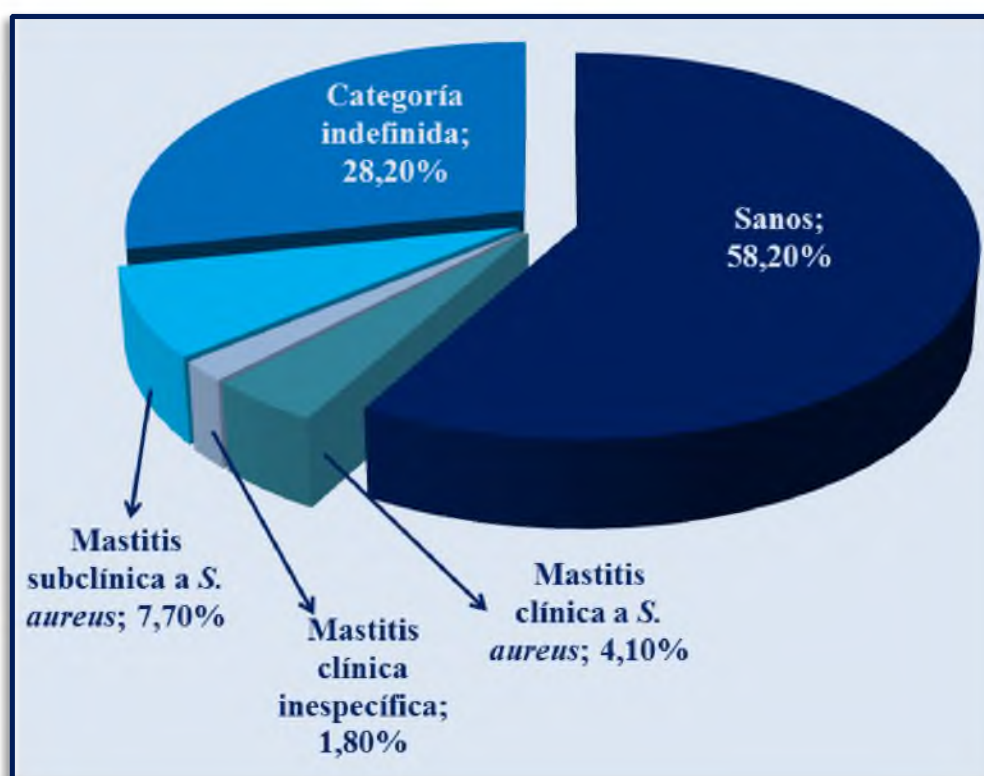


Figura 17. Prevalencia de mastitis en las vacas en lactancia radicadas en el departamento de Río Segundo, de acuerdo a los parámetros clínicos, la presencia en leche de *S. aureus* y  $RCS \geq 200.000$  cél/ml.

Considerando la IIM por *S. aureus* (casos clínicos y subclínicos tomados conjuntamente) se evidenció en forma bruta, para todos los tambos muestreados del departamento Río Segundo, una prevalencia de 11,8 % en vacas en período de lactancia. Por otra parte, teniendo en cuenta la categorización asignada a los tambos, se estableció una prevalencia específica de IIM por *S. aureus* de 47,6 %, 16,4 % y 7,8 % para los tambos precarios, regulares y buenos,



respectivamente; a su vez, las ubres de las vacas en lactancia de los tambos muy buenos estaban todas sanas (tabla 8).

Tabla 8. Prevalencia de infección intramamaria (IIM) por *Staphylococcus aureus*.

Categorías de tambos	Composición de la muestra		
	Tambos (Nº)	Vacas en lactancia (Nº)	IIM <i>S. aureus</i> (Nº; %)
Precarios	3	21	10 (47,6)
Regulares	13	152	25 (16,4)
Buenos	13	141	11 (7,8)
Muy buenos	9	76	0
<b>Todos</b>	<b>38</b>	<b>390</b>	<b>46 (11,8)</b>

Según los datos de la encuesta, y acorde a las variables que se tuvieron en cuenta para categorizar a los tambos (tabla 5), se consideraron algunas características que podían predisponer a la presencia de mastitis en cada categoría. Como se observa en la tabla 9, la mayoría de los factores de riesgo se presentan en los tambos precarios, concordante con la elevada presencia de mastitis en los mismos. El no apartar vacas con mastitis clínica en los últimos 6 meses fue el factor que se presentó en mayor proporción tanto a nivel departamental (76,3 %) como en cada categoría de tambos. Esto podría responder a que en un importante número de establecimientos se prioriza el caudal de producción sobre la calidad de la leche. Le siguió en jerarquía de proporción tanto a nivel departamental (31,6 %) como por categoría, la inexistencia de un orden de ingreso de los animales a la sala de ordeño en un mismo rodeo. Cabe acotar que en los tambos que aplicaron a la categoría de “muy buenos” no sostenían ningún criterio de orden de ingreso debido a la existencia de tambos sanitarios aparte, para los casos de animales enfermos.

Se puede observar que en la totalidad de los tambos precarios además de exponer los dos factores de riesgo antes mencionados, no se empleaba CMT para mastitis subclínica, el personal no contaba con la capacitación técnica, ni usaban guantes en el ordeño y los cambios de pezoneras no seguían las indicaciones del fabricante. El resto de los factores predisponentes de mastitis se sostuvieron en el 66,7 % de dichos tambos.

En el resto de las categorías las proporciones de exposición de factores de riesgo disminuyeron a medida que la calidad de los establecimientos creció.

Tabla 9. Proporción de tambos que poseen los factores de la encuesta planteados como predisponentes para la adquisición y/o persistencia de mastitis por *S. aureus*.

Factores predisponentes de mastitis	Tambos				TOTAL
	Precarios	Regulares	Buenos	Muy buenos	
<b>Ordeño manual</b>	2/3 (66,7 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	0,0	3/38 (7,9 %)
<b>Control de mastitis a cargo de personal no veterinario</b>	2/3 (66,7 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	0,0	3/38 (7,9 %)
<b>No emplean CMT<sup>1</sup> para mastitis subclínica</b>	3/3 (100,0 %)	2/13 (15,4 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	6/38 (15,8 %)
<b>No realizan control lechero</b>	2/3 (66,7 %)	2/13 (15,4 %)	2/13 (15,4 %)	2/9 (22,2 %)	8/38 (21,1 %)
<b>No hacen prueba de primeros chorros</b>	2/3 (66,7 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	0,0	3/38 (7,9 %)
<b>No remiten al laboratorio muestras sospechosas de mastitis</b>	2/3 (66,7 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	0,0	3/38 (7,9 %)
<b>Animales con mastitis y sanos ordeñados sin un orden preestablecido</b>	3/3 (100,0 %)	3/13 (23,1 %)	3/13 (23,1 %)	3/9 (33,3 %)	12/38 (31,6 %)
<b>No apartan vacas con mastitis clínica (últimos 6 meses)</b>	3/3 (100,0 %)	12/13 (84,6 %)	11/13 (92,3 %)	3/9 (33,3 %)	29/38 (76,3 %)
<b>No realizan sellado de pezones post-ordeño</b>	2/3 (66,7 %)	2/13 (15,4 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	5/38 (13,2 %)
<b>Control de máquina de ordeño poco frecuente (&gt; 3 meses)</b>	2/3 (66,7 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	0,0	3/38 (7,9 %)
<b>Cambio de pezoneras sin seguir las indicaciones del fabricante</b>	3/3 (100,0 %)	3/13 (23,1 %)	2/13 (15,4 %)	2/9 (22,2 %)	10/38 (26,3 %)
<b>Personal no usa guantes en el ordeño</b>	3/3 (100,0 %)	2/13 (15,4 %)	1/13 (7,7 %)	0,0	6/38 (15,8 %)
<b>Personal sin capacitación técnica para tareas relacionadas al ordeño</b>	3/3 (100,0 %)	3/13 (23,1 %)	3/13 (23,1 %)	0,0	9/38 (23,7 %)

<sup>1</sup>CMT: test California para mastitis.

Según la tabla 8 se aprecia que el mayor porcentaje de mastitis por *S. aureus* (47,6%) es debido a los 3 tambos precarios que participaron en el muestreo. Asumiendo que esta categoría es la que presentó la mayor exposición para la presentación de la enfermedad y considerando al resto de los tambos como el grupo de menor exposición, fue posible el cálculo de la razón de prevalencias y la prevalencia atribuible para el grupo expuesto (tabla 10). De acuerdo a ello, el riesgo de presentar mastitis por *S. aureus* fue 4,9 veces mayor ( $p < 0,0001$ ) en las vacas de los tambos precarios respecto a los animales del resto de los tambos. A su vez, se puede inferir que el 37,9 % de la prevalencia del grupo expuesto es atribuible a las condiciones de precariedad de dichos tambos ( $p < 0,0001$ ).

Tabla 10. Razón de prevalencias y prevalencia atribuible en el grupo expuesto.

Categoría de tambo	IIM <i>S. aureus</i>	Razón de prevalencias	Prevalencia atribuible
	(Nº; %)	(IC 95%)	(%) (IC 95%)
Precarios (expuestos)	10 (47,6)	4,9 (2,8 - 8,4)*	37,9 (16,3-59,4)*
Resto (no expuestos)	36 (9,8)		

\* $p < 0,0001$ ; IIM: infección intramamaria; IC 95 %: intervalo de confianza del 95 %.

#### IV.1.3. Análisis de la asociación entre los factores de riesgo hipotéticos y la presencia de mastitis por *S. aureus*

En la tabla 11 se aprecian los resultados del análisis bivariado para evaluar la asociación entre los factores de riesgo (identificados *a priori*) con la presentación de IIM por *S. aureus* en las vacas estudiadas, independientemente de la categorización de tambos explicada precedentemente. Los OR permitieron valorar cuantas veces fue la probabilidad de que estos animales presenten IIM por *S. aureus* debido a la exposición a un determinado factor de riesgo, respecto de aquellos que estaban bajo la influencia de factores de protección.

Tabla 11. Factores de riesgo asociados con la presentación de IIM por *S. aureus*. Cantidad de casos (%), *Odds ratio*,  $p < 0,05$ .

Factores de riesgo	Condición	Casos (%)	<i>Odds Ratio</i> (IC 95 %)	$p^*$
<b>Responsable del control de mastitis</b>	Personal no veterinario	10 (31,25)	4,07 (1,81-9,13)	0,0004
	Médico Veterinario	36 (10,06)		
<b>Uso de CMT para mastitis subclínica</b>	No	13 (31,71)	4,45 (2,12-9,31)	< 0,0001
	Si	33 (9,46)		
<b>Realiza control lechero</b>	No	21 (19,63)	2,52 (1,35-4,70)	0,0032
	Si	25 (8,83)		
<b>Realiza prueba de los primeros chorros</b>	No	10(31,25)	4,07 (1,81-9,13)	0,0004
	Si	36 (10,06)		
<b>Presencia de vacas con mastitis clínica al momento del muestreo</b>	Si	15 (5,21)	5,55 (1,02-30,1)	0,0643
	No	1 (0,98)		
<b>Remite al laboratorio muestras sospechosas de IIM</b>	No	10(31,25)	4,07 (1,81-9,13)	0,0004
	Si	36 (10,06)		
<b>Orden en que hace ingresar a la sala de ordeño los animales sanos y con mastitis</b>	En cualquier orden	46 (14,65)	-	
	Primero los sanos, luego los enfermos	0 (0)		
<b>Aparta vacas con mastitis clínica crónicas (últimos 6 meses)</b>	No	42 (13,68)	3,13 (1,09 - 8,99)	0,0264
	Si	4 (4,82)		
<b>Realiza sellado de pezones post ordeño</b>	No	12 (30)	3,98 (1,88 - 8,45)	0,0002
	Si	34 (9,71)		
<b>Tipo de ordeño</b>	Manual	7 (58,33)	12,17 (3,86-38,38)	< 0,0001
	Mecánico	39 (10,32)		
<b>Frecuencia en los controles de la máquina ordeño</b>	> 3 meses	8 (44,44)	7,03 (2,68-19,44)	< 0,0001
	≤ 3 meses	38 (10,22)		
<b>Tiempo de cambio de pezoneras</b>	Cuando se gastan	32 (20,78)	4,16 (2,16-8,02)	< 0,0001
	Según indicación del fabricante	14 (5,93)		

Tabla 11 (continuación)

<b>Empleo de guantes en tareas de ordeño</b>	No	13 (34,21)	5,03 (2,38-10,64)	< 0,0001
	Si	33 (9,38)		
<b>Personal con capacitación técnica</b>	No	35 (19,55)	4,42 (2,20-8,89)	< 0,0001
	Si	11 (5,21)		

(\*)  $p$ : significativo  $p < 0,05$ ; CMT: test de California para mastitis; IC: 95 % intervalo de confianza correspondiente al 95 %.

De acuerdo a ello, se pudo deducir que las vacas que se ordeñaban manualmente tenían 12,17 (intervalo de confianza 95 %: IC 3,86 - 38,38) más probabilidades de presentar IIM por *S. aureus* respecto a aquellas ordeñadas mecánicamente.

Otros factores de riesgo que demostraron asociaciones significativas con las IIM por *S. aureus* ( $p < 0,05$ ) luego del tipo de ordeño y, expresados en orden decreciente (según el valor del OR) fueron: la frecuencia en el control de la máquina de ordeño superior a los 3 meses (OR= 7,03); la falta de uso de guantes durante el ordeño (OR= 5,03); la ausencia de aplicación de CMT para mastitis subclínica (OR= 4,45); la falta de capacitación del personal (OR= 4,42); la omisión de las recomendaciones del fabricante en cuanto al período de tiempo para el cambio de las pezoneras (OR= 4,16); el control de la mastitis llevados a cabo por personal no veterinario, la ausencia rutinaria en la realización de la prueba de los primeros chorros y la remisión al laboratorio de muestras sospechosas de mastitis (OR = 4,07 para estas tres variables); la omisión del sellado pos ordeño (OR= 3,98); no haber apartado vacas con mastitis clínica crónicas en los últimos 6 meses (OR= 3,13); y la falta sistemática de controles lecheros (OR= 2,52).

En cuanto al factor expresado como “orden en que ingresan a la sala de ordeño los animales sanos y con mastitis” no pudo ser calculado su OR debido a la inexistencia de un orden preestablecido de ingreso en todos los tambos. Por otra parte, si bien existe asociación en la observación de mastitis al momento del ordeño (OR = 5,55), la misma no fue significativa ( $p= 0,0643$ ).

Las variables que resultaron asociadas en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en el análisis anterior fueron sometidas a una regresión logística mediante un modelo mixto lineal generalizado. Del total de variables analizadas sólo resultaron significativas ( $p < 0,05$ ) el tipo de ordeño empleado y la capacitación del personal del tambo (tabla 12). De dicho análisis surge que la pertenencia del individuo a un tambo con ordeño manual tiene 6,95 más probabilidades de

presentar una IIM a *S. aureus* y triplica las posibilidades cuando el personal del tambo no está capacitado.

Tabla 12. Variables sometidas a un modelo mixto lineal generalizado que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ).

Parámetros	Estadístico	E.E.	Odds Ratio (IC 95 %)	$p^*$
<b>Constante</b>	-0,336	0,59	0,72 (0,23 – 2,26)	0,566
<b>Tipo de ordeño</b>	1,938	0,62	6,95 (2,05 – 23,56)	0,002
<b>Capacitación del personal</b>	1,119	0,35	3,06 (1,53 – 6,13)	0,002

(\*)  $p$ : significativo  $p < 0,05$ ; E.E.: error estándar; IC: 95 % intervalo de confianza correspondiente al 95 %.

## IV.2. Resultados relacionados a los péptidos antimicrobianos

### IV.2.1. Aislamientos de bacterias ácido lácticas y determinación de la actividad antibacteriana de las sustancias inhibitorias presentes en los extractos libres de célula

De las 133 muestras seleccionadas para el aislamiento de BAL, fueron aisladas 54 cepas con sus ELCSN y ELCN correspondientes para su conservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; de las cuales, 12 resultaron ser morfológicamente cocos y 42 bacilos, en todos los casos Gram positivos.

La actividad antimicrobiana de las sustancias inhibitorias presentes en los ELC, frente a las cepas de *S. aureus* productoras de mastitis fue valorada utilizando la técnica de difusión en agar. De 54 pares de ELCSN y ELCN, 13 (24 %) presentaron halos de inhibición antimicrobiana (anexo VIII.5).

La tabla 13 concentra las medidas de resumen de las mediciones de los halos generados por los ELC en sus formas “sin neutralizar” y “neutralizados” por separado. Se puede observar que la media de los halos de los ELCSN fue  $3,82 \pm 0,60\text{ mm}$  y la media de los halos de los ELCN  $3,25 \pm 0,39\text{ mm}$ . El control positivo de referencia (bacteriocina nisina) expresó un halo de inhibición de  $3,98\text{ mm}$ .

La tabla 14 responde a la prueba estadística T para muestras apareadas, de la que se deduce que, considerando cada par de ELC por separado, existen diferencias significativas entre sus mediciones de halos, con evidencias suficientes para suponer que dichas mediciones son diferentes ( $p < 0,0001$ ). Esta diferencia a favor del grupo sin neutralizar podría deberse a que,

además de proteínas con perfil inhibitorio, poseen otras sustancias que no favorecen el desarrollo del *S. aureus*, generando halos de mayor medida que en los extractos neutralizados.

Tabla 13. Estadística descriptiva de la medida de los halos de inhibición microbiana de los extractos libres de células “sin neutralizar” y “neutralizados”.

ELC	Variable	n	Media	D.E.*	Mínimo	Máximo	Mediana
ELCSN	mm	13	3,82	0,60	2,96	4,68	3,99
ELCN	mm	13	3,25	0,39	2,74	3,76	3,26

(\*)Desviación estándar

Tabla 14. Prueba T (muestras apareadas) aplicada a cada par de extracto libre de célula “sin neutralizar” y “neutralizados”.

Obs (1)	Obs (2)	N	Media (dif	LI (95%))	LS (95%)	T	p
ELCSN (mm)	ELCN (mm)	13	0,57	0,38	0,76	6,44	< 0,0001

#### IV.2.2. Respuesta al tratamiento con proteinasa K y termoestabilidad a distintos pH

Los trece ELCN seleccionados en el experimento anterior fueron tratados con la enzima proteolítica proteinasa K en concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml. La valoración de la actividad antimicrobiana luego del tratamiento, resultó nula para ambas concentraciones de enzima usadas en cuatro ELCN (aislamientos correspondientes a las BAL identificadas con los números 81, 59, 90 y 108) dejando de manifiesto el carácter proteico de las sustancias inhibitoras presentes (figura 18). La media de la medida del halo de inhibición para el control negativo de tales ELCN fue de  $3,07 \pm 0,44$  mm.



Figura 18. Prueba de difusión en agar para uno de los ELCN tratados con proteinasa K, para valorar el carácter peptídico de la sustancia inhibitoria presente en el mismo. Se puede observar la presencia de halo de inhibición en el control negativo y la ausencia del mismo cuando el ELCN fue tratado con proteinasa K.



Las BAL número 59, 81, 90 y 108, cuyas sustancias inhibidoras presentes en los ELC demostraron poseer carácter peptídico, fueron descongeladas y cultivadas en caldo MRS. Los sobrenadantes de dichos cultivos obtenidos luego de ser centrifugados, recibieron dos tratamientos de alta temperatura (95 y 121 °C) a distintos pH (control sin calentamiento). Aun cuando los halos disminuyeron su diámetro para ambos tratamientos térmicos respecto del control sin calentamiento, quedó demostrado el carácter termorresistente en los cuatro casos, ya que la actividad antibacteriana no llegó a anularse. La muestra 59 respondió con una caída en la actividad antimicrobiana a medida que se aumentó el pH, tendencia que se acentuó con el aumento de calentamiento (figura 19). Para el caso de la muestra 81, la actividad a pH 5 fue menos eficaz para el tratamiento a 95 °C y el control pero se mejoró a 121 °C. La mejor respuesta en las tres situaciones se obtuvo a pH 6 con una caída de la eficacia a pH 7 y 8, siendo más drástica a 121 °C (figura 20). La muestra 90 en cada tratamiento sostuvo similitud de respuesta a pH 4 y 5, pero a pH superiores la actividad antimicrobiana tendió a disminuir (figura 21). La muestra 108 en todos los tratamientos demostró mejor actividad a pH 5, con una caída de la actividad a pH superiores (figura 22).

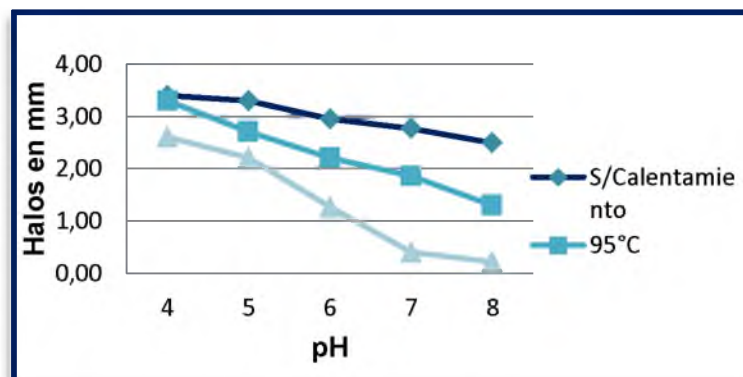


Figura 19. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 59.

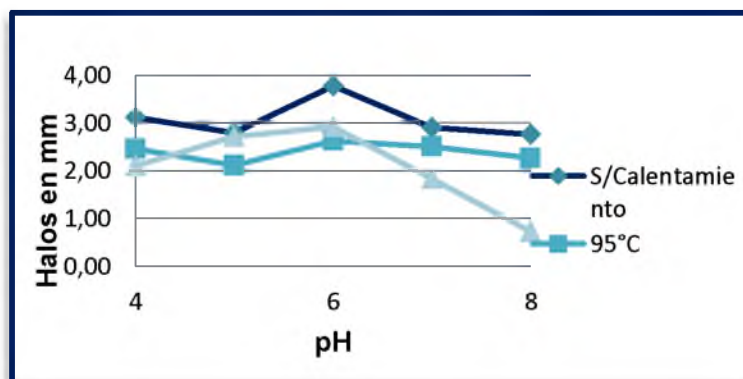


Figura 20. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 81.



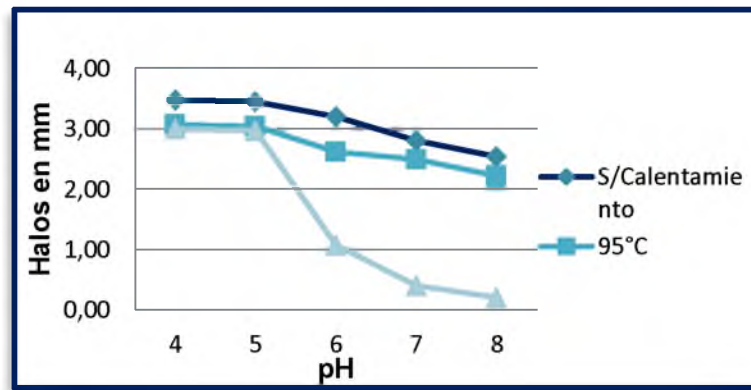


Figura 21. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 90.

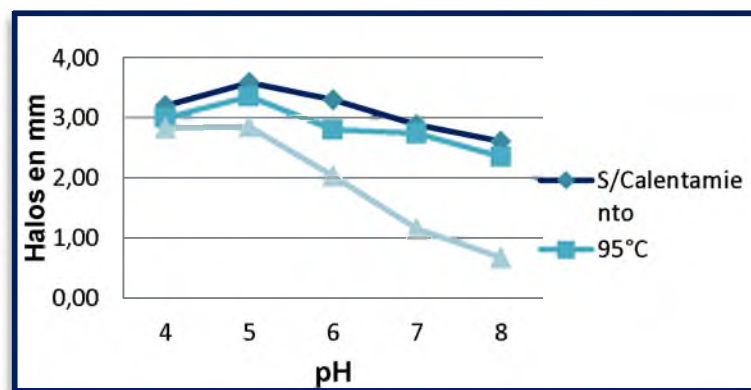


Figura 22. Termoestabilidad a distintos pH de los ELC de BAL número 108.

#### IV.2.3. Purificación, concentración y electroforesis de los péptidos antimicrobianos

El sobrenadante resultado de la aplicación del método de adsorción-desorción modificado a cada uno de los cultivos de BAL fue evaluado en su actividad antimicrobiana. Se obtuvieron halos de inhibición en los 4 casos. Idéntica valoración pero con resultados nulos, fueron para los primeros sobrenadantes descartados del proceso, evaluados a los fines de corroborar que no hubo pérdida de los PAs en el transcurso de la aplicación del método de adsorción-desorción (anexo VIII.6).

Para cada una de las muestras se realizaron electroforesis aplicando la técnica SDS - PAGE en 2 geles de acrilamida al 16 %, siguiendo el esquema planteado en el apartado III.2.5. Los geles resultantes de las electroforesis fueron similares en todos los casos a los observados en la figura 22. El gel 1 utilizado para evaluar la concentración del PA, está representado en la figura 23 por la imagen “c”. En esta imagen se puede observar de izquierda a derecha muestra la corrida del marcador de proteínas (PrM), de la muestra y de las cuatro diluciones de concentración

conocida de albúmina (100, 200, 400 y 800  $\mu\text{g/ml}$ ), necesarias para el cálculo de la concentración proteica de la banda 3 a través del programa ImageJ (anexo VIII.7). En la corrida correspondiente a la muestra se destaca la banda 3, ubicada entre 3,5 kDa y 10 kDa en referencia al marcador de proteínas. Esta banda es correlativa a la banda 3 la imagen “b”. En esta imagen se aprecia el gel correspondiente a la calle 2 fragmentado en 5 trozos a los cuales se les aplicó la prueba de inhibición del crecimiento microbiano (imagen “a”), manifestándose un halo de inhibición alrededor del fragmento 3. La imagen “d” muestra el gel 2 destinado para la identificación proteica de la fracción inhibidora por espectrometría de masa, del cual se cortó la banda ubicada entre 3,5 kDa y 10 kDa usando de referencia el marcador de proteínas.

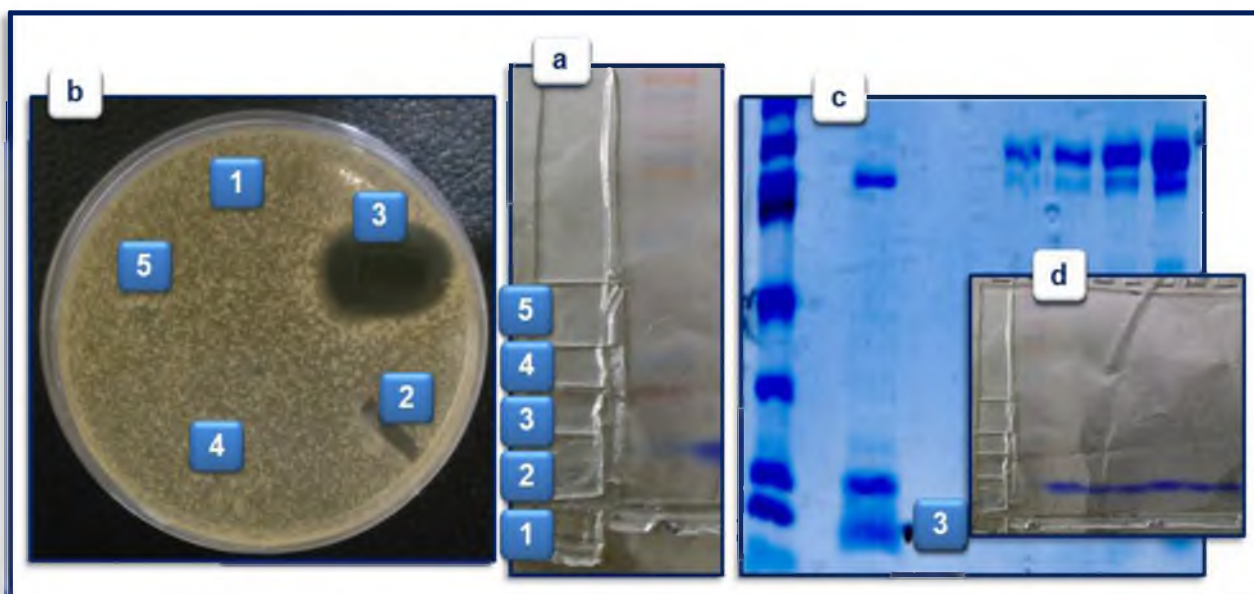


Figura 23. Resolución de los gels por electroforesis y actividad antibacteriana.

(a) Corte en fragmentos del gel corrido electroforéticamente correspondiente a la calle 2 (1- borde del gel, 2- correlativo a la banda de 3,5 kDa del PrM, 3- correlativo al espacio entre 3,5 kDa y 10 kDa del PrM, 4- correlativo a la banda de 10 kDa del PrM, 5- correlativo a la banda de 15 kDa del PrM). (b) Prueba de inhibición del crecimiento microbiano donde se manifiesta un halo de inhibición alrededor del fragmento 3. (c) De izquierda a derecha, corrida del PrM, de la muestra y de las cuatro diluciones de concentración conocida de albúmina. (d) Gel destinado para la identificación proteica de la fracción inhibidora por espectrometría de masa.

#### IV.2.4. Identificación de los péptidos antimicrobianos

A través del análisis por espectrometría de masas de los extractivos de muestras se identificaron los péptidos presentes en las fracciones de gels de la corrida electroforética del punto anterior (positivos a la prueba de inhibición del crecimiento microbiano). Las secuencias obtenidas fueron alineadas a secuencias de bacteriocinas y de otros péptidos ligados a estas,

reportados anteriormente en la base de datos NCBI ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). La tabla 15 concentra los resultados de las alineaciones entre secuencias de cada muestra con secuencias de la base de datos NCBI (anexo VIII.8).

Tabla 15. Resultados de las alineaciones entre las secuencias de cada péptido antimicrobiano en estudio con las secuencias de la base de datos NCBI.

PA	Secuencia	Péptidos [microorganismos] alineados con la secuencia	Cobertura de alineamiento	$p^*$	Identidad
59	TTHVAmVAGAIA	<i>Brevicin 174A immunity</i>	35 %	0,01	100 %
	LGYVTAQMITNV	<i>protein (plasmid)</i>			
	DKSK	<i>[Lactobacillus brevis]</i>			
81	AVPAVRKTNET	<i>Bacteriocin rhamnosin A, partial</i>	100 %	0,016	100 %
		<i>[Lactobacillus rhamnosus]</i>			
90	NPQTGEEIEIPASK	<i>Bacteriocin-associated</i>	57 %	0,0004	85 %
		<i>protein</i>			
108	RRDEISDLQR RDEISDLQR	<i>Bacteriocin cleavage/export</i>	84 %	0,002	58 %
		<i>ABC transporter</i>			
		<i>[Lactobacillus brevis]</i>			

\* $p$ : valor de significancia

El péptido resultado a partir del aislamiento 81 fue el único que respondió a bacteriocina. Tuvo la mejor cobertura de alineamiento (100 %) con la secuencia de la bacteriocina *rhamnosin A* (procedente de *Lactobacillus rhamnosus*), con un grado de significancia ( $p = 0,016$ ) indicativo de secuencias con una alta probabilidad de homología, lo que derivaría en una identidad del 100 %. El péptido 59 sólo tuvo una cobertura de alineamiento del 35 % con la proteína de inmunidad a bacteriocina *Brevicin 174A* (factor de auto - resistencia en *Lactobacillus brevis*), con un grado de significancia ( $p = 0,01$ ) indicativo de secuencias con una alta probabilidad de homología y con una identidad del 100 %. Para el caso del péptido 90, tuvo una cobertura de alineamiento del 57 % con una proteína asociada a bacteriocina de *Enterococcus faecium*, con un grado de significancia ( $p = 0,0004$ ) indicativo de secuencias con una alta probabilidad de homología y una identidad probable del 85 %. El péptido 108 evidenció una cobertura de alineamiento del 84 %

con el péptido ABC transportador de escisión / exportación de bacteriocina (*Lactobacillus brevis*), con una homología significativa ( $p = 0,002$ ) y una identidad probable del 58 %.

#### **IV.2.5. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias de bacterias ácido lácticas**

Para arribar al género de las bacterias de las cuales se obtuvieron los PAs, se empleó la base de datos BLAST, tal como fue descrito en materiales y métodos, apartado III.2.7.

Según la base de datos BLAST y se muestra en el anexo VIII.8, los aislamientos pertenecen al dominio Bacteria. Los aislamientos 59, 81 y 108 fueron clasificadas como perteneciente a *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, género *Lactobacillus*, identificados como *Lactobacillus spp.* Las especies más relacionadas fueron *L. brevis* para los aislamientos 59 y 108, ambos con una identidad del 99 % y para el aislamiento 81 fue *L. rhamnosus* con identidad del 92 %. El aislamiento 90 fue clasificado como perteneciente a *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Enterococcaceae*, género *Enterococcus*, identificados como *Enterococcus spp.* La especie más relacionada con el aislamiento 90 fue *E. faecium* con un 100 % de identidad. Como se puede observar, hubo concordancia entre los microorganismos identificados por este método y los presupuestos a partir del secuenciamiento de los PAs en el ítem anterior (IV.2.4).

### **IV.3. Distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas frente a *S. aureus***

#### **IV.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los ATMs frente a *S. aureus* aislados en leche**

La valoración del perfil de sensibilidad / resistencia para los ATMs (ampicilina, cloxacilina, tilosina, oxitetraciclina, penicilina y gentamicina) se logró mediante la prueba cuantitativa de dilución en agar (CLSI, 2013). Cabe aclarar que tanto el control positivo (*S. aureus* ATCC 29213) como el control negativo (solución fisiológica estéril) respondieron dentro de los rangos referencia estipulados tanto por CLSI y EUCAST.

La tabla 16 muestra la cantidad de cepas de *S. aureus* que resultaron inhibidas frente a las diferentes diluciones de cada ATM, en comparación con los puntos de corte clínicos de CLSI (2013) y EUCAST (2015). Cabe destacar que si bien la actividad ATM es variable entre fármacos de un mismo grupo, para aquellos ATMs que no cuentan con puntos de referencia en

CLSI y/o EUCAST, se consideró como tal el punto de corte clínico de un ATM de la misma familia, como para obtener una referencia.

Tabla 16. Número de cepas de *S. aureus* (n=46) que resultaron inhibidas (valores absolutos y porcentuales) frente a diferentes ATMs, tras la prueba cuantitativa de dilución en agar. Confrontación con los puntos de corte clínicos de CLSI (2013) y EUCAST (2015).

Diluciones de los ATMs (µg/ml)														Sin inhib.
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	
OXI			5 (11%)	2 (4,3%)	16 (34,8%)	8 (17,45%)	13 (28,3%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)					
CLX		9 (19,5%)	9 (19,5%)	4 (8,7%)	6 (13%)	6 (13%)	5 (11%)	5 (11%)	1 (2,2%)		1 (2,2%)			
GEN			17 (37%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	10 (21,7%)	7 (15,2%)	4 (8,7%)	2 (4,3%)				
TIL		27 (58,7%)	7 (15,2%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)		2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)				
AMP	9 (19,5%)	11 (23,9%)	6 (13%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	2 (4,3%)	6 (13%)	3 (6,5%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)			
PEN		9 (19,5%)	4 (8,7%)	9 (19,5%)	3 (6,5%)	6 (13%)	2 (4,3%)	3 (6,5%)	3 (6,5%)	3 (6,5%)	2 (4,3%)			2 (4,3%)
Puntos de corte clínicos de referencia					Cepas sensibles (%)					Cepas resistentes (%)				
	CLSI		EUCAST			CLSI		EUCAST			CLSI		EUCAST	
OXI	S ≤ 4; R ≥ 16 (t, m, d)		S ≤ 1 - R > 1 (t)			100		97,8			0		2,2	
CLX	S ≤ 2 - R ≥ 4		-			97,8		-			2,2		-	
GEN	S ≤ 4 - R ≥ 16		S ≤ 1 - R > 1			96		87			0		13	
TIL	S ≤ 0,5 - R ≥ 8 (e)		S ≤ 1 - R > 1 (e)			87		91			0		9	
AMP	S ≤ 0,12 - R ≥ 0,25		S ≤ 0,12 - R > 0,12			63		63			37		37	
PEN	S ≤ 0,12 - R ≥ 0,25		S ≤ 0,12 - R > 0,12			54		54			46		46	

OXI: oxitetraciclina, CLX: cloxacilina, GEN: gentamicina, TIL: tilosina, AMP: ampicilina, PEN: bencilpenicilina; S: sensible, R: resistente; t: tetraciclina, m: minociclina, d: doxiciclina, e: eritromicina. Las líneas verticales de colores rojo y verde, indican los puntos de corte para CLSI (2013) y EUCAST (2015), respectivamente.

De la confrontación con los puntos de corte clínico de CLSI surge que el 100 % de las cepas de *S. aureus* se inhibieron ante oxitetraciclina, gentamicina y tilosina en valores de concentración inferiores a los puntos de corte indicativos de resistencia. Sin embargo, para los dos últimos ATMs, hubo un 4 % y 13 % (gentamicina y tilosina, respectivamente) de cepas que lo hicieron en valores de concentración intermedios entre los puntos de corte de sensibilidad y resistencia. Manifestaron resistencia ante cloxacilina (2,2 %), ampicilina (37 %) y penicilina (46 %).

Los cinco ATMs cotejados con los puntos de corte propuestos por EUCAST (oxitetraciclina, gentamicina, tilosina, ampicilina y penicilina) demostraron resistencia en el orden del 2,2 %, 13 %, 9 %, 37 % y 46 %, respectivamente.

La tabla 17 concentra la cantidad de cepas de *S. aureus* que resultaron inhibidas frente a las diferentes diluciones de cada ATM, en comparación con los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) de EUCAST (2015). De su análisis surge que en todos los casos se registraron cepas que inhibieron en concentraciones superiores a los puntos de corte epidemiológicos, siendo penicilina la que obtuvo la mayor proporción de resistencia (46 %).

Tabla 17. Número de cepas de *S. aureus* (n=46) que resultaron inhibidas (valores absolutos y porcentuales) frente a diferentes ATMs, tras la prueba cuantitativa de dilución en agar. Confrontación con los puntos de corte epidemiológicos-ecoff EUCAST (2015).

Diluciones de los ATMs (µg/ml)														
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	Sin inhib.
OXI			5 (11%)	2 (4,3%)	16 (34,8%)	8 (17,45%)	13 (28,3%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)					
CLX		9 (19,5%)	9 (19,5%)	4 (8,7%)	6 (13%)	6 (13%)	5 (11%)	5 (11%)	1 (2,2%)		1 (2,2%)			
GEN			17 (37%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	10 (21,7%)	7 (15,2%)	4 (8,7%)	2 (4,3%)				
TIL		27 (58,7%)	7 (15,2%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)		2 (4,3%)	2 (4,3%)	2 (4,3%)				
AMP	9 (19,5%)	11 (23,9%)	6 (13%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	2 (4,3%)	6 (13%)	3 (6,5%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)			
PEN		9 (19,5%)	4 (8,7%)	9 (19,5%)	3 (6,5%)	6 (13%)	2 (4,3%)	3 (6,5%)	3 (6,5%)	3 (6,5%)	2 (4,3%)			2 (4,3%)
Puntos de corte Epidemiológico - ecoff EUCAST								Cepas sensibles (%)			Cepas resistentes (%)			
OXI	0,25 (m); 0,5 (d)						96			4				
CLX	0,5						85			15				
GEN	2						96			4				
TIL	1 (e)						91			9				
AMP	0,5						80			20				
PEN	0,12						54			46				

OXI: oxitetraciclina, CLX: cloxacilina, GEN: gentamicina, TIL: tilosina, AMP: ampicilina, PEN: bencilpenicilina; S: sensible, R: resistente; t: tetraciclina, m: minociclina, d: doxiciclina, e: eritromicina. Las líneas verticales de color amarillo, indican los puntos de corte epidemiológicos-ecoff para EUCAST (2015).

Considerando las frecuencias relativas (% de cepas inhibidas de *S. aureus*) se determinaron las CIM en el 50 % y el 90 % de la población bacteriana (CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente) para cada ATM (figuras 24, 25, 26, 27, 28 y 29).



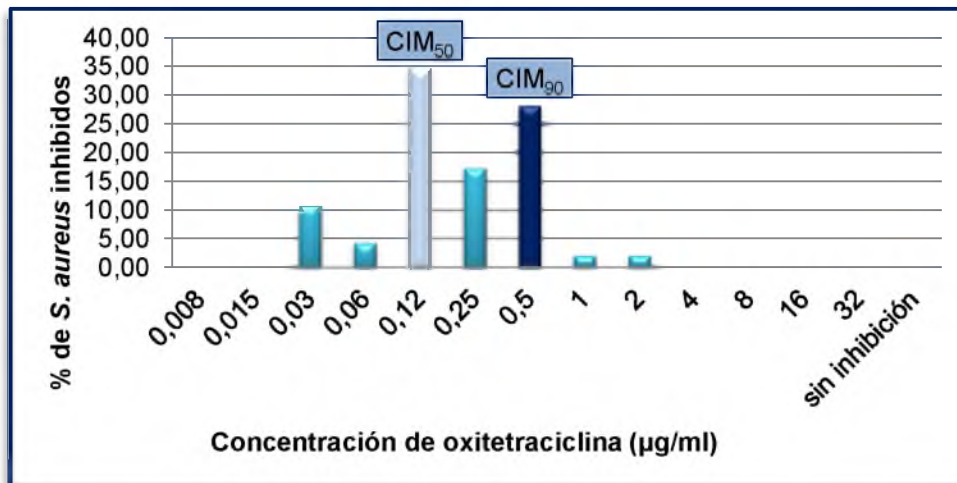


Figura 24. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por oxitetraciclina.

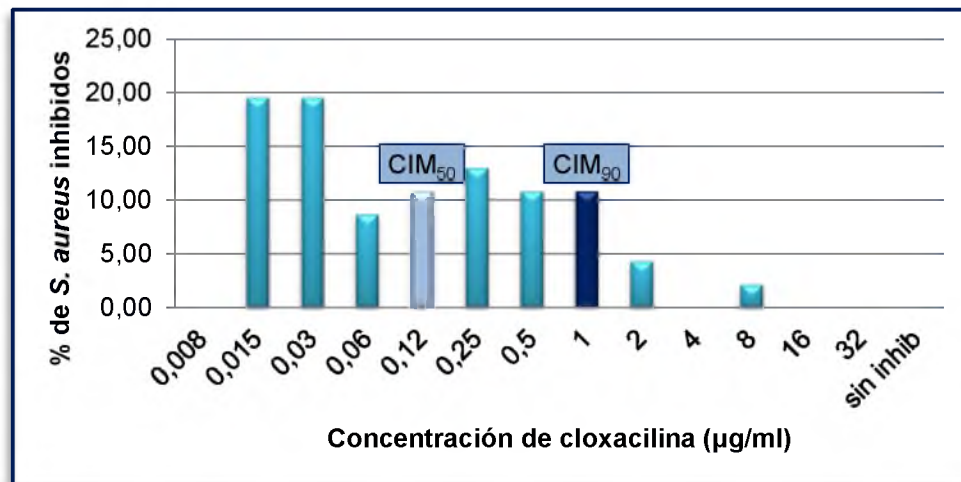


Figura 25. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por cloxaciclina.

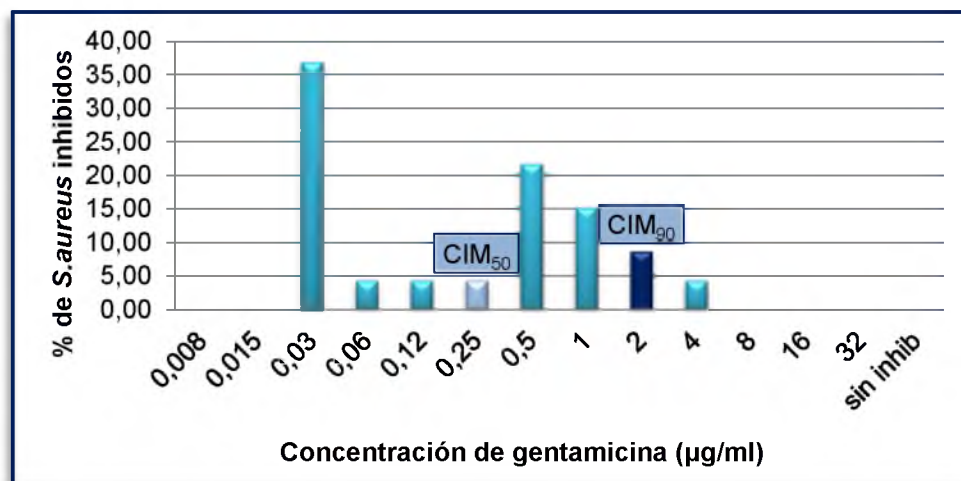


Figura 26. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por gentamicina.

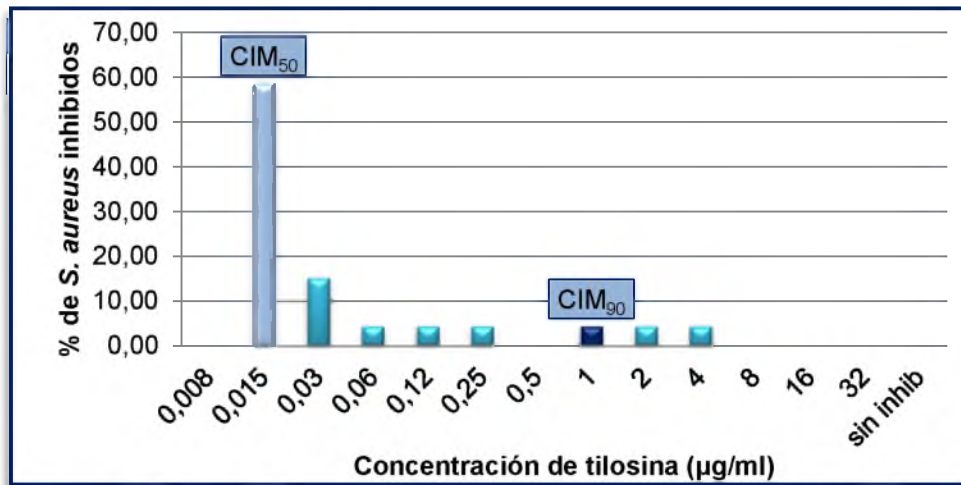


Figura 27. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por tilosina.

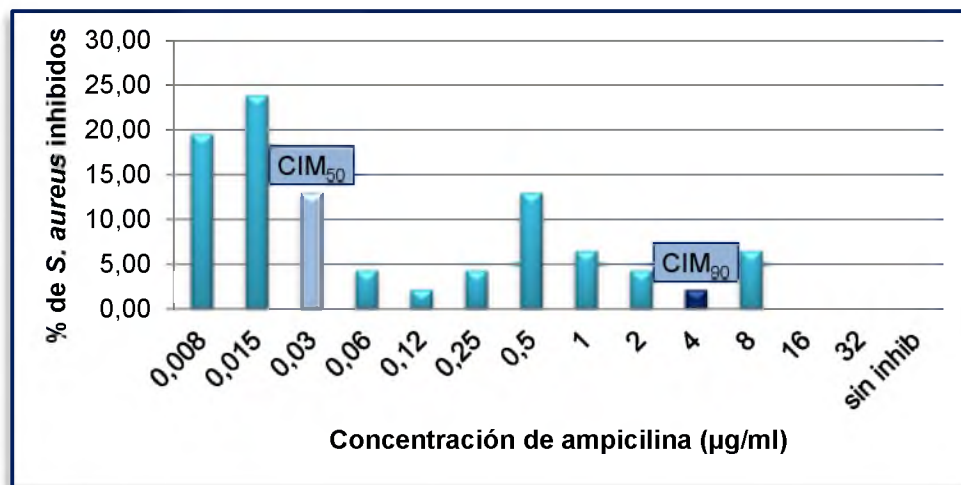


Figura 28. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por ampicilina.

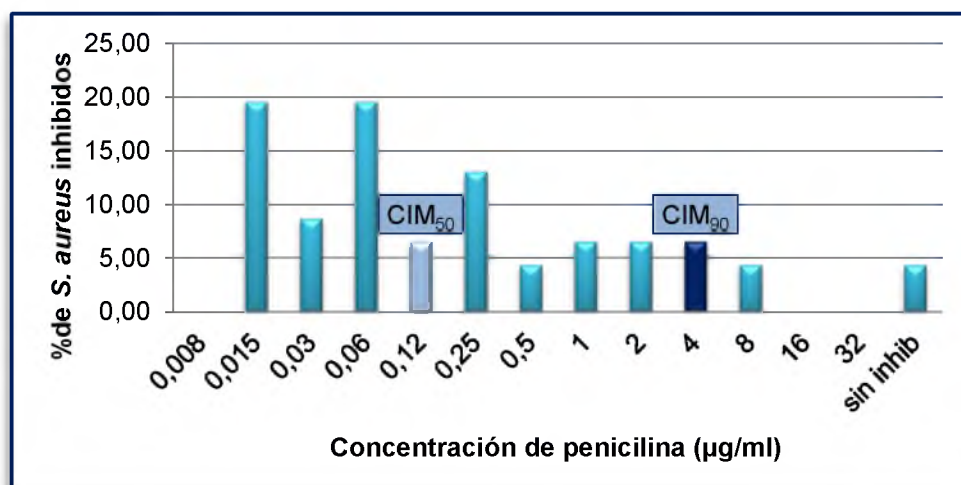


Figura 29. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por penicilina.



Las gráficas representativas de distribución de las cepas de *S. aureus* inhibidas a las distintas concentraciones, demuestran que oxitetraciclina manifestó una distribución monomodal bilateral, en forma de campana; en cambio tilosina y cloxacilina si bien presentaron una distribución monomodal, fue de tipo unilateral, desplazada hacia la izquierda lo que es indicativo de una mayor sensibilidad por parte del patógeno, que se manifiesta con un alto número de cepas inhibidas a diluciones bajas. Penicilina mostró claramente la existencia de dos poblaciones, una sensible y otra resistente, con un 4,35 % de las cepas que no fueron inhibidas a ninguna de las concentraciones aplicadas. Gentamicina tuvo una distribución bimodal y ampicilina trimodal indicando una población salvaje sensible a bajas diluciones y subpoblaciones que podrían contar con cierta resistencia adquirida para las que se necesitó de diluciones más altas para su inhibición. Si bien desde el punto de vista terapéutico, la CIM<sub>50</sub> no tiene mayor inferencia, es de utilidad analizar cuanto se separa de ella la CIM<sub>90</sub> ya que a mayor alejamiento entre ambas, se sugiere una tendencia a la resistencia. Esto se manifestó claramente para ampicilina y penicilina.

De la comparación de las CIM<sub>90</sub> de los ATMs con los puntos de corte clínicos de CLSI (2013) y clínicos y epidemiológico - ecoff de EUCAST (2015) surge que la CIM<sub>90</sub> de oxitetraciclina y tilosina fueron las únicas que se mantuvieron en valores inferiores a los propuestos como puntos de cortes clínicos y epidemiológicos (CLSI, 2013; EUCAST, 2015).

Penicilina reveló una resistencia del 45,65 % y 32,61 % según los puntos de corte clínicos sugeridos por EUCAST y CLSI respectivamente; y también fue superior al punto de corte epidemiológico sugeridos por EUCAST. Indéntica situación fue la observada para ampicilina que demostró tener una CIM<sub>90</sub> superior a los puntos de corte clínicos de EUCAST y CLSI (resistencia del 37 % en ambos casos) y al punto de corte epidemiológico sugerido por EUCAST. En el caso de gentamicina, si bien su CIM<sub>90</sub> es inferior respecto del punto de corte clínico de CLSI y del epidemiológico de EUCAST, es superior al punto de corte clínico de EUCAST con una resistencia del 12,5 %. Cloxacilina manifestó una CIM<sub>90</sub> inferior al punto de corte clínicos de CLSI pero superior al epidemiológico de EUCAST. Las CIM<sub>90</sub> de penicilina, ampicilina y cloxacilina fueron superiores al punto de corte epidemiológico o “Epidemiological CutOFF - ECOFF” según EUCAST.

#### IV.3.2. Estimación de las concentraciones de los péptidos antimicrobianos

Tras la electroforesis de las cuatro soluciones de referencia de albúmina con concentraciones 100, 200, 400 y 800  $\mu\text{g/ml}$ , se obtuvieron, mediante procesamiento digitalizado (ImageJ), las densidades relativas de las bandas de interés que se observan en la figura 30.

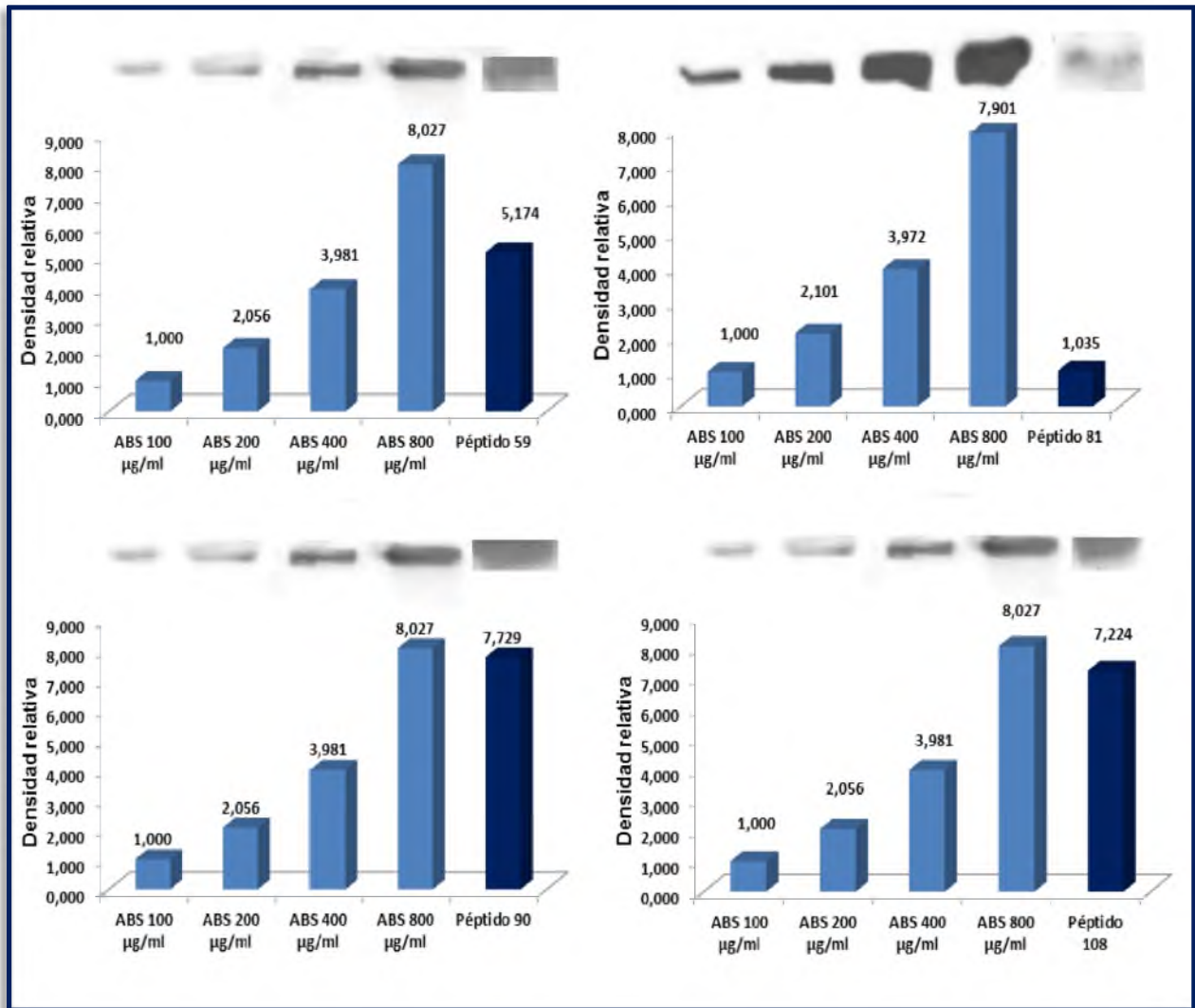


Figura 30. Densidades relativas de cada péptido antimicrobiano en función de concentraciones conocidas de albúmina, obtenidas por la utilización del programa ImageJ.

La relación de la densidad relativa de cada banda seleccionada respecto de las densidades relativas de las bandas de albúminas de concentraciones conocidas, permitió estimar la concentración de cada PA en los 25  $\mu\text{l}$  de siembra. A partir de este último resultado se conoció la concentración por ml (1.000  $\mu\text{l}$ ) de muestra. Posteriormente, 1 ml de muestra fue diluido en 10



58,70 % y 60,87 %, de las cepas de *S. aureus* por parte de los PAs 59, 81, 90 y 108, respectivamente. Esto dejó expuesta la incapacidad de inhibición en el 50 % y el 90 % de la población bacteriana (CIM50 y CIM90, respectivamente).

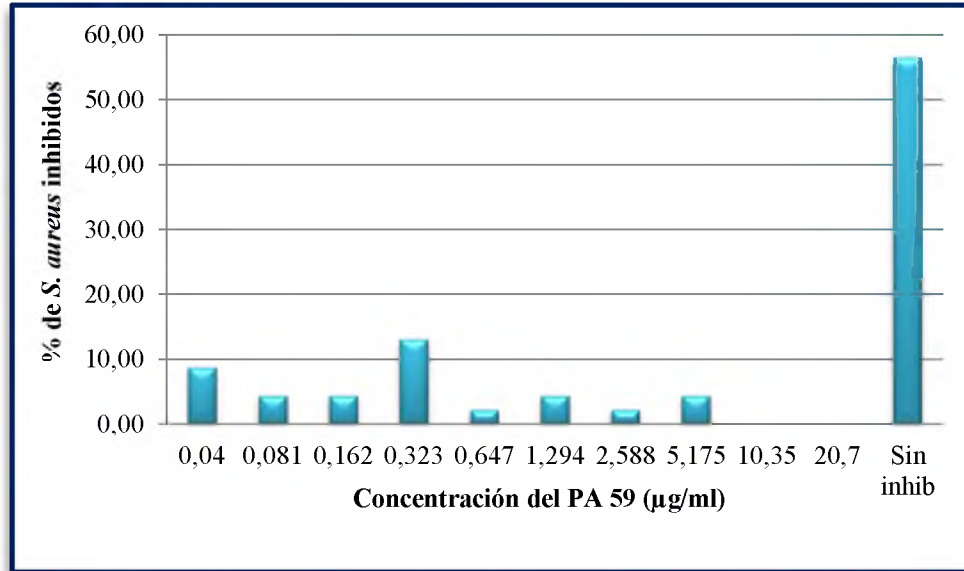


Figura 31. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por el péptido 59.

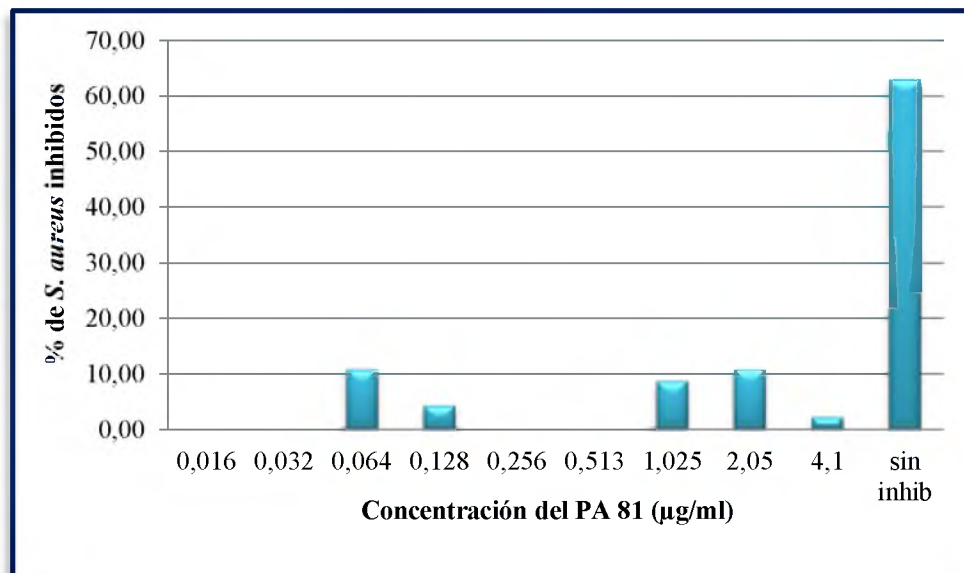


Figura 32. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por el péptido 81.

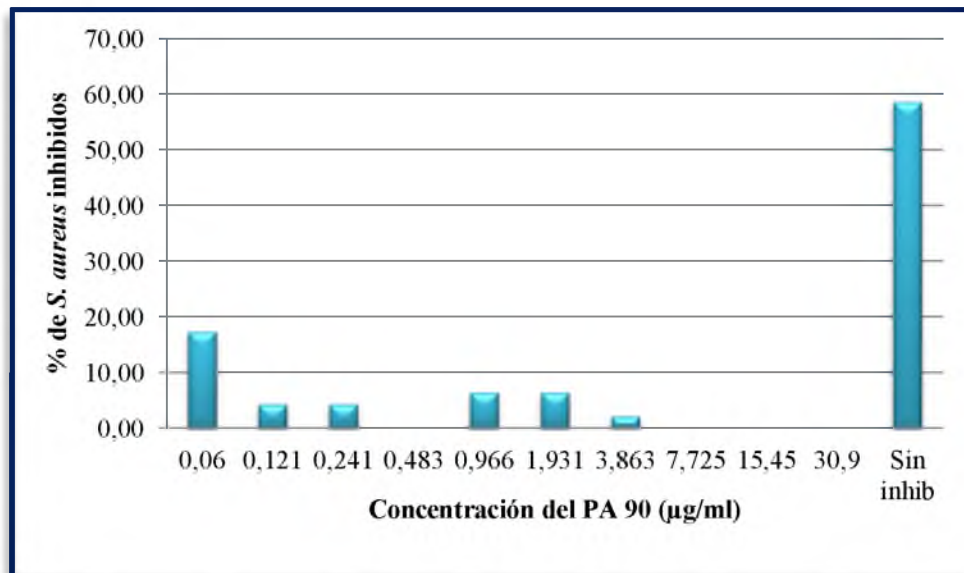


Figura 33. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por el péptido 90.

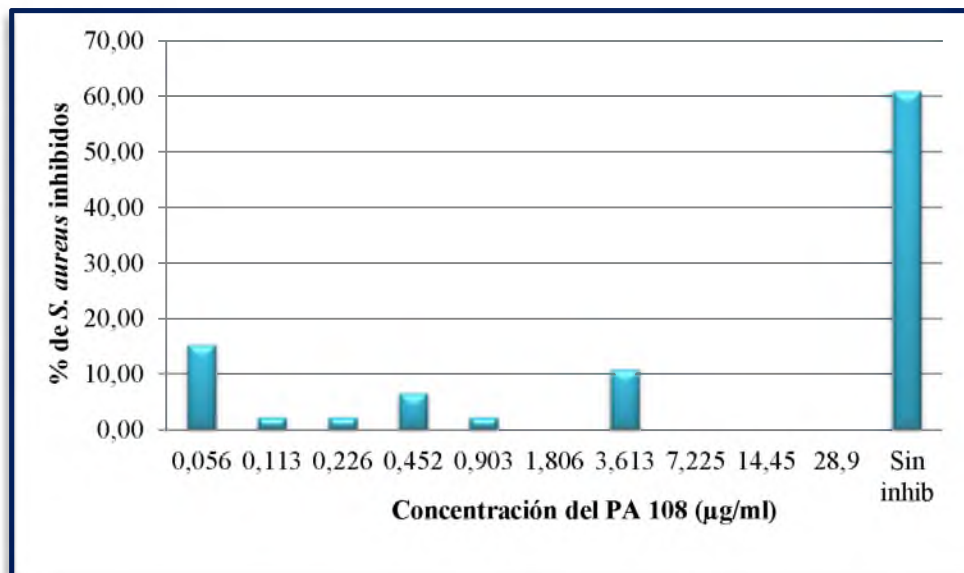


Figura 34. Distribución del porcentaje de *S. aureus* (n=46) inhibidos por el péptido 108.

#### IV.3.4. Comparación de las concentraciones inhibitorias mínimas y de las frecuencias relativas acumuladas de los péptidos inhibitorios respecto de los ATMs

Al no poderse establecer la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de los PAs hizo que se calcularan las CIM<sub>35</sub>, considerando que el 35 % de inhibición fue conseguido por todos los PAs. Debido a esto, a la estimación inicial de la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de los ATMs se le agregó también la de la CIM<sub>35</sub>. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 20.

Tabla 20. CIM<sub>35</sub>, CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de ATMs y los PAs.

ATM	CIM <sub>35</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
<b>OXI</b>	< 0,12	0,12	< 0,500
<b>CLX</b>	< 0,03	< 0,12	< 1,00
<b>GEN</b>	< 0,03	0,25	< 2,00
<b>TIL</b>	< 0,015	< 0,015	< 1,00
<b>AMP</b>	< 0,015	< 0,03	< 4,00
<b>PEN</b>	< 0,06	< 0,12	< 4,00
<b>PA 59</b>	< 1,294		
<b>PA 81</b>	< 4,100		
<b>PA 90</b>	< 1,931		
<b>PA 108</b>	< 3,613		

OXI: oxitetraciclina, CLX: cloxacilina, GEN: gentamicina, TIL: tilosina, AMP: ampicilina, PEN: bencilpenicilina; PA: péptido antimicrobiano.

De la tabla 20 se desprende que en todos los casos fueron superiores a las CIM<sub>35</sub> y CIM<sub>50</sub> de los ATMs probados. La CIM<sub>35</sub> de los PA 59 (< 1,294 µg/ml) y 90 (< 1,930 µg/ml) fueron inferiores a las CIM<sub>90</sub> de gentamicina (< 2,00 µg/ml), ampicilina (< 4,00 µg/ml) y penicilina (< 4,00 µg/ml), la del PA 108 (< 3,613 µg/ml) sólo fue inferior a la de ampicilina y penicilina y la del PA 81 (< 4,100 µg/ml) fue superior a la de todos los ATMs.

Debido a que no se pudo partir de soluciones de concentración conocidas de PAs, las CIM de estos se calcularon en rangos particulares en cada caso, distintos a los aplicados para los ATMs (32 a 0,008 µg/ml). No obstante, fueron contrastados a este por aproximación. El rango de dilución del PA 81 fue comparable entre 0,015 y 4 µg/ml, el del PA 59 entre 0,03 y 16 µg/ml y para los PAs 90 y 108 entre 0,06 y 32 µg/ml (anexo VIII.10).

Del análisis de los datos aportados por el anexo VIII.12 y la figura 35 que confronta el porcentaje de cepas de *S. aureus* inhibidos como frecuencia relativa acumulada (FRA %) con las distintas concentraciones utilizadas, se puede observar que oxitetraciclina fue el primero en conseguir la inhibición del 100 % de las cepas de *S. aureus*, seguido por tilosina y gentamicina. A una concentración mayor lo hizo cloxacilina y ampicilina, no consiguiéndolo penicilina, al menos en el rango empleado. Aun cuando los PAs en ningún caso lograron una inhibición del crecimiento del 100 %, para el caso del 59, 90 y 108 (43,48 %, 41,30 % y 39,13 %, respectivamente), alcanzaron un porcentaje mayor de inhibición respecto del 81 que sólo logró

inhibir un 36,96 %. Un detalle importante a tener en cuenta que del total de cepas de *S. aureus* (46), las dos que fueron resistentes a penicilina, se inhibieron ante los cuatro PAs.

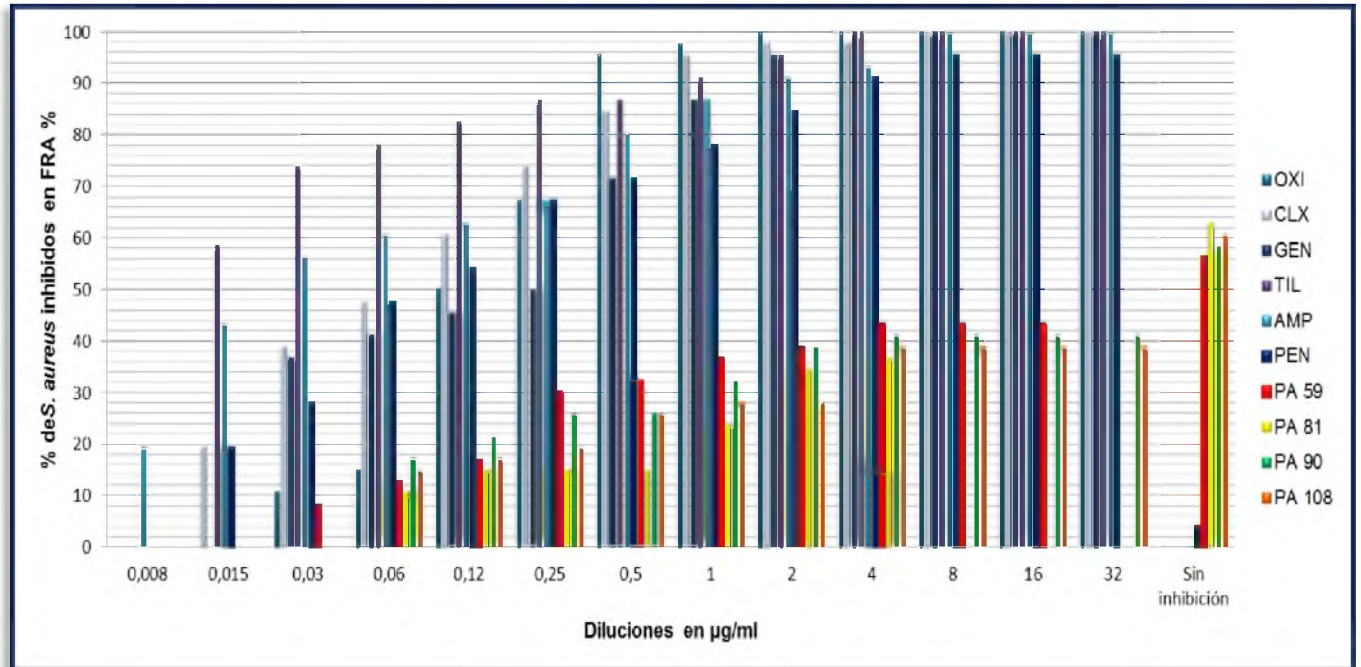


Figura 35. Cepas de *S. aureus* (n=46) inhibidos (FRA %) en las distintas concentraciones.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

---

### V.1. Diseño de la toma de muestra

La elaboración de un diseño estadístico de muestreo se tradujo en una obtención de muestras ( $n= 390$ ) provenientes de 38 tambos de todo el departamento (Mateu & Casal, 2003; Scheaffer *et al.*, 2005). Estos se seleccionaron en forma sistematizada, según su distribución geográfica a los fines de que estuviese todo el territorio representado. La selección de los animales por establecimiento se concretó en forma aleatoria y proporcional a la cantidad de vacas por tambo (Ramírez Vásquez *et al.*, 2011; Martínez Bencardino, 2016). Así se limitó el error por muestreo y se pudo caracterizar la variabilidad que se da dentro del mismo departamento respecto de las condiciones tecnológicas, socioeconómicas e higiénico-sanitarias y las formas de manejo de los rodeos, tal como lo plantea Orantes-Zebadúa *et al.*(2014). La conjunción de esta información permitió la concreción de un escenario representativo departamental sobre el cual extrapolar los resultados posteriores de prevalencias y perfiles de susceptibilidad a ATMs y PAs.

### V.2. Infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* a nivel departamental

La salud de las ubres, los RCS y los resultados bacteriológicos, son parámetros reportados sistemáticamente. En este trabajo se pudo observar que el 5,9 % de las vacas presentaron signos clínicos de IIM en al menos uno de los cuartos; el 63 % de los RCS fueron superiores al punto de corte de 200.000 cél/ml y se aislaron 46 cepas de *S. aureus*. La extrapolación de los tres parámetros permitió establecer cinco categorías de acuerdo al estado sanitario de las ubres. Se obtuvo una prevalencia del 11,8 % de mastitis causada por *S. aureus* en vacas en período de lactancia en dicha región, respondiendo el 4,1 % a la categoría de mastitis clínica y el 7,7 % a subclínica. El 88,2 % restante se distribuyó en las categorías de mastitis inespecífica, indefinida y sanos, en valores de 1,8 %, 28,2 % y 58,2 %, respectivamente.

Debido a la falta de datos históricos del departamento, de todos los resultados antes mencionados, solo pudo cotejarse la media de RCS con la conseguida en 1986 sobre 1100



muestras de los departamentos Río Primero y Río Segundo, donde se halló un valor sensiblemente superior de 596.564 cél/ml (Cravero *et al.*, 1989).

Históricamente *S. aureus* ha sido uno de los microorganismos más aislados en la provincia de Córdoba. Se reportaron resultados superiores a los aquí expuestos (11,8 %), por González *et al.* (1980) en un relevamiento realizado en los departamentos de Río Cuarto, Tercero Arriba, Juárez Celman y Gral. San Martín (43,27 %); Pellegrino *et al.* (2006) aislaron e identificaron 769 cepas del género *Staphylococcus*, de las que el 55 % eran estafilococos coagulasa positivos, siendo *S. aureus* (92 %) el más frecuente en muestras de la cuenca lechera de Córdoba; y sobre 271 muestras del centro sur de la provincia; y Pellegrino *et al.* (2011), aislaron 300 cepas bacterianas, de las cuales el 27,9 % fueron identificadas como *S. aureus*. Cabe acotar que la media de los RCS (363.130 cél/ml) obtenida fue sensiblemente inferior a la de Pellegrino *et al.* (2006), que asoció al 81 % de los aislamientos de *S. aureus* con RCS superiores a 800.000 cél/ml y a la de Pellegrino *et al.* (2011), que presentaron elevados RCS (> 200.000 cél/ml) en el 85,7 % de los establecimientos muestreados.

En Argentina se han realizado estudios para determinar la prevalencia de los microorganismos causantes de mastitis desde la década del '70, pudiéndose comprobar que las sucesivas correcciones en los aspectos higiénico-sanitarios (rutina de trabajo, chequeo de máquina de ordeño, sellado de pezón, terapia de secado, tratamiento de casos clínicos, descarte de vacas crónicas y control de calidad de los insumos que se utilizan), contribuyeron a una gradual disminución de los RCS desde mediados de la década de los 90, aunque siguen siendo elevados, comparados con los de los países de alto desarrollo lechero. *S. aureus* es uno de los agentes más aislados. En una revisión de resultados de prevalencia de microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria logrados en distintas investigaciones en la región pampeana (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa) desde fines de los años 70 hasta 2005, Calvino & Tirante (2005) ilustraron esta tendencia. Se puede observar que para *S. aureus* se encontraron aislamientos del 17 % al 54 % en las diferentes cuencas lecheras. En tambos del noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, entre 1993 y 2009, Revelli *et al.* (2011) demostraron un descenso de la media de RCS de 687.000 cél/ml a 423.000 cél/ml y además se encontró en la zona, una alta incidencia de *S. aureus* (43 %). Entre junio y diciembre de 2014 se analizó la calidad de leche en 26 tambos familiares del periurbano oeste del área metropolitana de Buenos Aires (Marcos Paz, La Matanza y Gral. Rodríguez), aislándose *S. aureus* en el 46 % de las muestras, las que en un 83

% estuvieron asociadas a RCS superiores a 200.000 cél/ml (Motta *et al.*, 2015). Los reportes antes mencionados arrojan valores de prevalencia de *S. aureus* y de media de RCS superiores a las obtenidas en esta investigación.

Respecto de reportes latinoamericanos, la prevalencia de mastitis bovina causada por *S. aureus* (11,8 %) en el departamento, es la misma a la informada por Ruiz *et al.* (2012) para 5 provincias de Cuba (Pinar del Río, Artemisa, Mayabeque, Sancti Spiritus y Camagüey) entre 2009 y 2012, y similar al 13 % del municipio de San Pedro de los Milagros, Colombia (Ramírez Vázquez *et al.*, 2011). Pero fue sensiblemente inferior para los reportados de la región centro–este del Estado de México (23 %) por Manjarrez López *et al.* (2012); de Cuba (29,3 %) por Peña & Uffo (2010); del sur de Uruguay (27,8 %), siendo además, el patógeno más frecuentemente aislado (Giannechini *et al.*, 2014); de estados venezolanos como Zulia, con aislamientos de *S. aureus* entre 25 y 45 % (Valero-Leal *et al.*, 2012) y Portuguesa donde fue el microorganismo más aislado, presente en casos de mastitis subclínica (41 %), clínica (45 %) y crónica (14 %) (Gutiérrez *et al.*, 2015); de reportes colombianos del 29,09 %, 43,72 %, 87,56 % y 26 % en el Altiplano Cundiboyacense, en el departamento de Arauca, en el municipio de Montería y en Boyaca, respectivamente (Calderón & Rodríguez, 2008; Calderón Rangel *et al.*, 2011; Mojica & Jaramillo, 2014; Barrera *et al.*, 2015).

### **V.3. Categorización de los tambos e incidencia de cada categoría en la prevalencia regional a *S. aureus*. Análisis estadístico de los factores de exposición (riesgo) asociados a mastitis en el departamento y en cada categoría**

La categorización de los tambos muestreados a partir de los datos obtenidos en la encuesta, reveló que respondieron a las categorías de precarios, regulares, buenos y muy buenos, un 7,9 %, 34,2 %, 34,2 %, 23,7 %, respectivamente.

Quedó demostrado que a mejores condiciones generales de los tambos, hubo una menor prevalencia específica de IIM por *S. aureus* (47,6 %, 16,4 % y 7,8 % para los tambos precarios, regulares y buenos, respectivamente, y nula para los tambos muy buenos). Es importante destacar que sólo 3 tambos que aplicaron a la categoría “precarios” aportaron el mayor porcentaje de mastitis por *S. aureus* (47,6 %). Fue idéntica la relación que se encontró entre la calidad de los tambos vs producción de litros de leche por vaca / día por categoría ( $14,7 \pm 2,0$  l / animal / d;  $17,3 \pm 1,4$  l / animal / d;  $23,0 \pm 1,6$  l / animal / d y  $29,1 \pm 2,4$  l / animal / d, fue la producción de tambos precarios, regulares, buenos y muy buenos, respectivamente). Esto es indicativo de que una mejor

producción lechera puede atribuirse a la optimización de estrategias de manejo de los rodeos; y que la calidad sanitaria es un aspecto clave para disminuir el nivel de infección y poder así aumentar la productividad (Martínez *et al.*, 2016; Oliszewski, 2016).

Según los datos de la encuesta, aquellos factores que se consideraron como predisponentes a la presencia de mastitis se presentaron prioritariamente en los tambos precarios, lo que fue concordante con la elevada presencia de mastitis en los mismos.

La política sostenida en establecimientos lecheros donde alcanzar un determinado caudal de producción subestima la necesidad de sostener la calidad de la leche y la salud animal, conlleva a que no sean apartadas vacas con mastitis clínica de las líneas de ordeño. De hecho, en este trabajo fue el factor que se presentó en mayor proporción tanto a nivel departamental (76,3 %) como en cada categoría de tambos. Ramírez *et al* (2016) sostiene que será necesario que las empresas lecheras asuman la importancia del mejoramiento del factor calidad, como parte fundamental del éxito en la comercialización de sus productos, sean éstos leche o sus derivados. Este mejoramiento debe ser una labor y un compromiso que se inicie en el tambo.

Le siguió en jerarquía de proporción tanto a nivel departamental (31,6 %) como por categoría, la inexistencia de un orden de ingreso de los animales a la sala de ordeño en un mismo rodeo. Contrariamente, Cominiello (2016) sostiene que es categórico mantener un orden de ordeño, dejando para el último la extracción de leche de los animales enfermos. De esta manera, se reduce el riesgo de enfermar a los animales sanos. Se constató además que en ningún tambo existían espacios sanitarios separados para el ordeño de animales enfermos.

Además de exponer los dos factores de riesgo antes mencionados, en todos los tambos precarios no se empleaba CMT para mastitis subclínica, el personal no contaba con la capacitación técnica, ni usaban guantes en el ordeño y los cambios de pezoneras no seguían las indicaciones del fabricante. Contrariamente, Ramírez Vásquez *et al.* (2011) concluyeron en que la realización periódica del CMT (97 % de especificidad y 82 % de sensibilidad) favorece al diagnóstico precoz de mastitis subclínica. Martínez *et al.* (2016) afirmaron que la idoneidad del operario tambero respecto de la rutina de ordeño, el favorecimiento al bienestar animal y mejoramiento continuo de su entorno, es una característica determinante para el buen funcionamiento de un tambo. Cominiello (2016) advirtió sobre la necesidad de cumplir con las normas de higiene necesarias tanto para cuidado del propio tambero como así también para evitar ser un vector de contagio entre los animales. Por otra lado, también sugirió que la renovación de las pezoneras no se realice en un periodo de tiempo determinado, sino cuando empiecen a

deslizarse hacia abajo en la ubre de forma continua y además que no hayan superado los 2500 ordeños.

El resto de los factores predisponentes de mastitis se sostuvieron para los tambos precarios en el orden del 66,7 %. En las demás categorías las proporciones de exposición de factores de riesgo disminuyeron a medida que la calidad de los establecimientos creció.

Asumiendo entonces que la categoría precario fue la más expuesta para la presentación de la enfermedad, se pudo demostrar que el riesgo de presentar la enfermedad fue 4,9 veces mayor ( $p < 0,0001$ ) respecto a los animales del resto de los tambos, y que el 37,9 % de su prevalencia fue atribuible específicamente a las condiciones de precariedad de dichos tambos.

Se realizó un análisis bivariado en la búsqueda de asociación entre los factores de riesgo con la presentación de IIM por *S. aureus* en las vacas estudiadas, independientemente de la categorización de tambos. Los OR resultantes permitieron valorar cuantas veces fue la probabilidad de que estos animales presenten IIM por *S. aureus* debido a la exposición a un determinado factor de riesgo, respecto de aquellos que estaban bajo la influencia de factores de protección.

De acuerdo a ello, se pudo deducir que las vacas que se ordeñaban manualmente tenían 12,17 (intervalo de confianza 95 %: IC 3,86 - 38,38) más probabilidades de presentar IIM por *S. aureus* respecto a aquellas ordeñadas mecánicamente. De hecho el 58,33 % de estos animales demostraron tener IIM por *S. aureus*, constituyéndose así el factor de riesgo con mayor proporción de animales enfermos. Este valor de OR es ostensiblemente mayor al de 0,81 informado por Ramírez Vásquez *et al.* (2011) para el ordeño manual.

En orden decreciente, otros factores de riesgo que demostraron asociaciones significativas con las IIM por *S. aureus* ( $p < 0,05$ ) fueron la frecuencia del control de las máquinas de ordeño superior a los 3 meses, OR= 7,03 (2,68 - 19,44); la falta de uso de guantes durante el ordeño, OR= 5,03 (2,38 - 10,64); la ausencia de aplicación de CMT para mastitis subclínica, OR= 4,45 (2,12 - 9,31); la falta de capacitación del personal, OR= 4,42 (2,20 - 8,89); la omisión de las recomendaciones del fabricante en cuanto al período de tiempo para el cambio de las pezoneras, OR= 4,16 (2,16 - 8,02); el control de la mastitis llevados a cabo por personal no veterinario, la ausencia rutinaria en la realización de la prueba de los primeros chorros y la remisión al laboratorio de muestras sospechosas de mastitis, OR= 4,07 (1,81 - 9,13); la omisión del sellado pos ordeño, OR= 3,98 (1,88 - 8,45); no haber apartado vacas con mastitis clínica crónicas en los últimos 6 meses, OR= 3,13 (1,09 - 8,99); y la falta sistemática de controles lecheros, OR= 2,52

(1,35 - 4,70). En cuanto al factor expresado como “orden en que ingresan a la sala de ordeño los animales sanos y con mastitis” no pudo ser calculado su OR debido a la inexistencia de un orden preestablecido de ingreso en todos los tambos. Por otra parte, si bien existe asociación en la observación de mastitis al momento del ordeño (OR = 5,55), la misma no fue significativa ( $p=0,0643$ ).

Ramírez Vásquez *et al.* (2011), Martínez Pacheco *et al.* (2015) y a nivel provincial Vissio *et al.* (2015), también analizaron factores de exposición asociados a mastitis en vacas. La deficiente práctica de sellado pos ordeño, fue uno de los factores más relevantes que se encontraron en coincidencia con los aquí considerados. Cabe destacar, que dicho factor sólo no fue relevado en la categoría de tambos “muy bueno”, mientras que paralelamente en la categoría “precario” fue positivo en el 66,7 %.

El uso de inadecuadas prácticas de higienización, también aparece asociado a la presencia de mastitis (Ramírez Vásquez *et al.*, 2011; Martínez Pacheco *et al.*, 2015) lo que sería comparable con los factores aquí analizados, bajo la denominación de “falta de capacitación del personal”, factor que sólo estuvo ausente en la categoría “muy bueno”, adquiriendo incidencia del 100 % en los precarios. Vissio *et al.* (2015), además observaron que casi un 20 % de los productores solo utilizaba como medida de control el tratamiento de casos de mastitis clínica, el 23 % no realizaba terapia de secado. Esto podría compararse con el factor de exposición aquí considerado “personal no veterinario en el control de la mastitis”, ya que esto presupone que un médico veterinario a cargo del control del rodeo establecerá dichas prácticas u otras, siempre que sean necesarias para mantener un estado saludable de los animales.

A diferencia de Ramírez Vásquez *et al.* (2011), que aplicó un modelo de regresión logística, las variables (factores de riesgo) que resultaron asociadas en forma significativa ( $p < 0,05$ ) fueron sometidas a una regresión logística mediante un modelo mixto lineal generalizado. De esta manera se pudo evaluar las asociaciones entre los factores de riesgo con la presencia de IIM por *S. aureus*, influenciadas por la variable “tambo muestreado” como intercepción aleatoria. La elección de este modelo en particular se fundamentó en que los efectos o influencias de las variables explicativas (factores de riesgo) sobre la respuesta (presencia de IIM a *S. aureus*) se suponen similares sobre animales de un mismo tambo, pero pueden diferir respecto de los animales de otros tambos ya que es factible una diferencia en el manejo de los rodeos (Papp *et al.*, 2017). De este análisis sólo resultaron significativas ( $p < 0,05$ ) el tipo de ordeño empleado y la capacitación del personal del tambo. Se concluye entonces que la pertenencia del individuo a

un tambo con ordeño manual tiene 6,95 más probabilidades de presentar una IIM a *S. aureus* y triplica las posibilidades cuando el personal del tambo no está capacitado.

Concluyendo en que las pérdidas económicas causadas por la mastitis están influenciadas sensiblemente por el grado de aplicación de medidas de control y prevención. Todos estos son ejemplos que ratifican los resultados obtenidos y que en su conjunto indican la necesidad de sostener medidas de manejo de los rodeos. Será primordial la planificación de estrategias tanto para la detección a tiempo, como para el control de los factores de riesgo lo que se traducirá en ubres sanas y calidad de producción lechera.

#### **V.4. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* regionales frente a los ATMs convencionales**

La evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, patógeno causante de mastitis, es una herramienta valiosa en el control de la enfermedad. Esto tiene más trascendencia aún si se realiza con cepas representantes de una región geográfica determinada, ya que los patrones de resistencia y la diversidad de las cepas varían en función de cada región. Respecto de los seis ATMs (oxitetraciclina, tilosina, penicilina, ampicilina, gentamicina y cloxacilina) que se utilizaron en este trabajo, cada uno sostuvo patrones de susceptibilidad / resistencia particulares. La oxitetraciclina consiguió la inhibición del 100 % de las cepas de *S. aureus* a diluciones más bajas, seguido por tilosina y gentamicina. A una concentración mayor lo hizo cloxacilina y ampicilina, no consiguiéndolo penicilina, al menos, en el rango de diluciones empleado.

De la confrontación de las diluciones máximas necesarias para la inhibición total del crecimiento microbiano con los puntos de corte clínico de CLSI surge que el 100 % de las cepas de *S. aureus* se inhibieron ante oxitetraciclina, gentamicina y tilosina en valores de concentración inferiores a los puntos de corte indicativos de resistencia. Sin embargo, para los dos últimos ATMs, hubo un 4 % y 13 % (gentamicina y tilosina, respectivamente) de cepas que lo hicieron en valores de concentración intermedios entre los puntos de corte de sensibilidad y resistencia. Manifestaron resistencia ante cloxacilina (2,2 %), ampicilina (37 %) y penicilina (46 %). Con respecto a los puntos de corte propuestos por EUCAST, ante todos los ATMs (oxitetraciclina, gentamicina, tilosina, ampicilina y penicilina) demostraron resistencia (2,2 %, 13 %, 9 %, 37 % y 46 %, respectivamente). En comparación con los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) de EUCAST (2015), en todos los casos se registraron cepas que inhibieron en concentraciones

superiores a los puntos de corte epidemiológicos, siendo penicilina la que obtuvo la mayor proporción de resistencia (46 %).

La concentración inhibitoria mínima ha sido el indicador más utilizado en terapias antimicrobianas, durante décadas. Si un ATM se mantiene en el organismo en concentraciones por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo, será capaz de inhibir el desarrollo de esa bacteria con comodidad. Este concepto es dinámico y depende de los nuevos descubrimientos respecto de cómo se modifican los perfiles de sensibilidad / resistencia de los distintos ATMs, tanto en tiempo como en espacio. Sin embargo la CIM continúa siendo un parámetro fundamental, sin cuyo conocimiento no tendríamos posibilidades de éxito en terapia antibacteriana. Tal es así que EUCAST como CLSI al establecer puntos de corte para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad, lo hacen a través de procedimientos que se fundamentan en el análisis de las CIM, así como en la aplicación de diferentes variables farmacocinéticas y farmacodinámicas que permiten relacionar los resultados del antibiograma con la respuesta clínica a un determinado ATM (Cuenca-Estrella, *et al.*, 2013; Esparza *et al.*, 2014; Canut & Martínez-Martínez, 2014). A continuación se analizan los valores de CIM obtenidos para cada ATM en relación a los puntos de corte de CLSI y EUCAST como así también a otros valores ya reportados para idénticos ATM frente a *S. aureus*.

Para el caso de penicilina, si bien manifestó sensibilidad en el 95,65 % de las cepas de *S. aureus*, fue resistida por el 4,35 % de ellas, las que no se inhibieron a ninguna de las concentraciones aplicadas. Se observó un alejamiento de su CIM<sub>90</sub> (< 4,00 µg/ml) en relación al valor de CIM<sub>50</sub> (< 0,125 µg/ml), lo cual sustentaría la tendencia a la resistencia. Confrontando los puntos de corte clínicos propuestos por EUCAST (2015) y CLSI (2013) con la CIM<sub>90</sub> de penicilina se pudo observar una resistencia del 45,65 % y 32,61 %, respectivamente. También fue superior al punto de corte epidemiológico sugerido por EUCAST. Salvando la diversidad de métodos empleados, estos valores se asemejan a los porcentajes de resistencia a penicilina hallados en Uruguay (39,1 % de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos subclínicos y 36 % de casos clínicos) y en México (44,7 %) según lo reportado por Giannechini *et al.* (2014) y López-Vázquez *et al.* (2015), respectivamente. Fueron superiores a reportes de Nueva Zelanda (28 %), Polonia (23,6 %), Colombia (23,2 %) y la Península Ibérica (30,4%) (McDougall *et al.*, 2014; Szweda *et al.*, 2014; Barrera *et al.*, 2015; Ortega *et al.*, 2017); e inferiores a resistencias valoradas en Italia (69,1 %), Portugal (66,7 %) y Turquía (45,5 %) (Moroni *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2007; Aslantaş & Demir, 2016).

Es importante destacar la llamativa variabilidad de tasas de resistencia a penicilina, condicionada tanto por espacio y tiempo en que hayan sido informadas. Esto se comprenderá mejor si a los ejemplos antes referenciados, se les suma reportes como el de Gutiérrez *et al.* (2015) desde Venezuela con el 100 % de las cepas inhibidas (0 % de resistencia) o el de Thomas *et al.* (2015) que informaron una resistencia del 36 % para Europa, alcanzada en ocho países que oscilaron entre el 11,9 y 65,8 %. La menor resistencia se registró en Alemania, Bélgica y los Países Bajos, y la más alta en Irlanda, la República Checa e Italia. Situación similar de variabilidad de resistencias ya había sido informada en 2002 por San Martín *et al.* para distintas regiones de Chile (entre el 26,7 al 50,8 %).

La amplia resistencia de los *S. aureus* a la penicilina G se debe a diferentes mecanismos como lo son la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa, la modificación de las proteínas de unión a las penicilinas y la resistencia intrínseca a meticilina, por incorporación a su genoma del gen *mecA*, constituyéndose una problemática importante el aumento sostenido de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (Szweda *et al.*, 2014; López-Vázquez *et al.*, 2015; Aslantaş & Demir, 2016). Modelo de esto, es lo informado por Giannechini *et al.* (2014), de cuya investigación se desprendió que el 100 % de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina eran productores de la enzima  $\beta$ -lactamasa. Esto constituye un alerta epidemiológica a nivel mundial ya que las tasas de curación en los casos de mastitis causada por cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina parecen ser inferiores a las de los casos de mastitis causada por cepas susceptibles a la penicilina (López-Vázquez *et al.*, 2015; Pyörälä, 2016; Song *et al.*, 2016).

El resto de los ATMs fueron capaces de inhibir todas las cepas de *S. aureus* a las distintas concentraciones empleadas. La oxitetraciclina manifestó una CIM<sub>90</sub> (< 0,5  $\mu$ g/ml) por debajo de los puntos de cortes clínicos y epidemiológicos por CLSI (2013) y EUCAST (2015). Igual inhibición de todas las cepas empleadas fue el resultado obtenido por McDougall *et al.* (2014). Sin embargo, ya en 2002 San Martín *et al.* y Yoshimura *et al.* reportaron valores superiores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> a las aquí logrados (2,0  $\mu$ g/ml y 4,0  $\mu$ g/ml; 0,78  $\mu$ g/ml y 1,56  $\mu$ g/ml, respectivamente). En 2007, Nunes *et al.* en Portugal, obtuvieron idéntico valor de CIM<sub>50</sub> (0,125  $\mu$ g/ml), menor CIM<sub>90</sub> (0,25  $\mu$ g/ml). San Martín *et al.* (2002), Nunes *et al.* (2007) y Thomas *et al.* (2015) además informaron resistencias a oxitetraciclina entre el 5,7 al 15,9 %, 3,3% y 58,8 %, respectivamente.

La cloxacilina no demostró resistencia en coincidencia con lo obtenido por Moroni *et al.* (2006), McDougall *et al.* (2014) y Thomas *et al.* (2015). De hecho, tuvo un alto número de cepas



inhibidas a diluciones bajas. No obstante, si bien su CIM<sub>90</sub> fue inferior al punto de corte clínicos de CLSI (2,2 %), fue superior al epidemiológico de EUCAST. Aun cuando suele ser el ATM primero en elección frente a cepas de *S. aureus* betalactamasa positivas (Pyörälä, 2016), se conocen registros de resistencia (San Martín *et al.*, 2002; Martínez Pacheco *et al.*, 2015).

La tilosina no expresó resistencia al igual que a lo conseguido por McDougall *et al.* (2014), contando con un alto número de cepas inhibidas a diluciones bajas. Su CIM<sub>90</sub> se mantuvo por debajo de los puntos de cortes clínicos y epidemiológicos por CLSI (2013) y EUCAST (2015). Cabe acotar que tilosina no es un ATM comúnmente empleado en mastitis bovina a *S. aureus*, sin embargo fue uno de los ATMs seleccionados para la experimentación ya que al ser utilizado en el tratamiento de otras enfermedades como la neumonía, se pretendió ver el grado de resistencia que podría estar generando sobre las cepas regionales de *S. aureus*, como se está manifestando en otros microorganismos (González-Hein *et al.*, 2013; Barberio *et al.*, 2016; Heuvelink *et al.*, 2016).

La gentamicina manifestó la existencia de al menos dos subpoblaciones con diferente sensibilidad pero logró inhibir todas las cepas de *S. aureus* al igual que lo informado por Nunes *et al.* (2007), Giannechini *et al.*, (2014) y Aslantaş & Demir (2016). Su CIM<sub>90</sub> si bien fue superior al punto de corte clínico de EUCAST con una resistencia del 12,5 %, fue inferior respecto del punto de corte clínico de CLSI y del epidemiológico de EUCAST. Ya en 2002, Yoshimura *et al* y San Martín *et al.* reportaban resistencia a gentamicina del 3,9 % y entre el 1,4 al 20 %, respectivamente. López-Vázquez *et al.* (2015) también notificaron 2,3 % de resistencia.

La ampicilina sostuvo una población salvaje sensible a bajas diluciones y subpoblaciones que podrían contar con cierta resistencia adquirida para las que se necesitó de diluciones más altas para su inhibición. Aval de esta tendencia a la resistencia fue el alejamiento existente entre su CIM<sub>90</sub> (< 4,00 µg/ml) y CIM<sub>50</sub> (< 0,032 µg/ml). La CIM<sub>90</sub> de ampicilina fue superior a los puntos de corte clínicos de EUCAST y CLSI, denotando una resistencia del 37 % respecto de ambos casos, como así también fue superior al punto de corte epidemiológico propuesto por EUCAST.

La variabilidad de tasas de resistencia a ampicilina es amplia, estando el valor encontrado en este trabajo (37 %) incluido en ese rango. En el 2002 San Martín *et al.* reportaron resistencia a ampicilina del 23,3 al 52,3 %. En el 2014 Giannechini *et al.* informaron valores del 39,1 % en aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos subclínicos y del 36 % de casos clínicos. También lo hicieron López-Vázquez *et al.* (2015) en México (50,6 %); Barrera *et al.* (2015) en Colombia

(23,2 %); McDougall *et al.* (2014) en Nueva Zelanda (27 %); Szweda *et al.*, (2014) en Polonia (22,8 %); Aslantaş & Demir (2016) en Turquía (39,3 %). La resistencia más elevada fue encontrada por Moroni *et al.* (2006) para Italia (98,5 %).

A pesar de que el número de cepas empleadas fue insuficiente para proponer un punto de corte de CIM que diferencie cepas bacterianas salvajes (sin adquisición de resistencia) de las resistentes, las CIM<sub>90</sub> de penicilina, ampicilina y cloxacilina fueron superiores al punto de corte epidemiológico según EUCAST. Si bien esto no fue indicativo de resistencia, expresó una sensibilidad acotada, la cual deberá ser tomada en cuenta desde el punto de la vigilancia epidemiológica.

La mastitis es una enfermedad prevalente en la vaca lactante que requiere intervenciones rápidas. Toda la vida productiva del ganado lechero está expuesta a los ATMs ya sea terapéutica o profilácticamente, logrando que crezca la resistencia. A nivel mundial existe una tendencia ascendente de valores de CIM de agentes antimicrobianos convencionales (Giannechini *et al.*, 2014; McDougall *et al.*, 2014; Szweda *et al.*, 2014; Aslantaş & Demir 2016; Pyörälä, 2016; Ortega *et al.*, 2017), y simultáneamente se sucede una marcada disminución en el desarrollo de nuevos ATMs por parte de la industria farmacéutica (Alós, 2015). Esto hace que la elección de antibióticos eficaces sea cada vez más limitada (Heuvelink *et al.*, 2016).

El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo y adaptativo de los microorganismos, por lo cual inevitablemente, no solo está presente, sino que va aumentando con el paso del tiempo y variando de una región a otra. Con el fin de utilizar prudentemente los agentes antimicrobianos será de vital importancia mantener el control periódico de los niveles de sensibilidad a distintos ATMs y la vigilancia de la aparición de resistencia, tanto en el tiempo como en el espacio geográfico (Martínez Pacheco *et al.*, 2015). Esto se destaca como una herramienta clave para optimizar la terapia farmacológica veterinaria, permitiendo en situaciones de emergencia ayudar a proporcionar una terapia empírica racional para salvar las vidas de los animales enfermos y asegurar su bienestar.

Será categórico asumir que el éxito de que los microorganismos patógenos no se vuelvan multirresistentes, dependerá de todos los actores de la sociedad. Más aún si se tiene en cuenta que siempre termina repercutiendo en el ser humano debido a la transmisión de genes de resistencia. En esta realidad el médico veterinario es una pieza clave a la hora de contribuir con acciones como la elaboración de registros de cada establecimiento, en el que conste los medicamentos y la posología empleada, permitiendo establecer patrones de rotación de fármacos en las distintas

zonas y la permanente educación del personal a cargo de los animales respecto de la importancia de trabajar en conjunto y así de esta manera extender el período de susceptibilidad de los ATMs en las distintas regiones. Será necesario a futuro, la determinación de puntos de corte clínicos específicos para *S. aureus* de la región, la normalización de los métodos para determinar los valores de CIM, así como estudios moleculares (PCR) para la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *S. aureus*. El conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia, permitirá hacer modificaciones farmacológicas para recuperar la sensibilidad de los antibacterianos y con ello contrarrestar la ineficacia producto del desarrollo de resistencia (Martínez Pacheco *et al.*, 2013).

#### **V.5. Bacterias ácido lácticas y péptidos antimicrobianos. Susceptibilidad de los *S. aureus* regionales frente a los péptidos antimicrobianos en comparación con los antimicrobianos**

Del potencial de las bacteriocinas para modificar y controlar los ecosistemas microbianos derivó el objetivo principal de este trabajo, que fue cuantificar la actividad antibacteriana *in vitro* de las bacteriocinas procedentes de bacterias ácido lácticas (BAL), frente a cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina. Los procedimientos que se fueron aplicando a lo largo de la investigación tuvieron que ver con metodologías inherentes a la identificación de bacteriocinas y sus microorganismos productores (Schanzenbach, 2005; Trivedi *et al.*, 2014; Noda *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). Es así que partiendo de 133 muestras de leche se aislaron 54 cepas de BAL y se elaboraron sus ELC. De estas, fueron seleccionadas cuatro cepas (aislamientos 81, 59, 90 y 108) cuyos ELC sostuvieron accionar antimicrobiano frente a *S. aureus*. La pérdida de esta actividad luego del tratamiento con proteinasa K, dejó de manifiesto su carácter proteico. A través de tratamientos térmicos a distintos pH, también quedó demostrado el carácter termorresistentes de las sustancias en los cuatro casos (Schanzenbach, 2005).

Las identificaciones genotípicas de los aislamientos bacterianos se consiguieron mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. Esta técnica también fue empleada por García *et al.* (2016) en la identificación de BAL predominantes en subproductos del procesamiento de pulpa de fruta y por Oliveira *et al.* (2017) que aislaron de heces de ratones una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* L156.4. El aislamiento 81 respondió a *L. rhamnosus*, el 59 y 108 fueron identificados como *L. brevis*, y el 90 como *E. faecium*. Las tres BAL son de conocido accionar probiótico. Numerosos trabajos respaldan que la administración de estos

microorganismos vivos en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped (Moreira Da Silva *et al.*, 2013; Fukao *et al.*, 2013; Mendonça *et al.*, 2014; Swain *et al.*, 2014; Cruchet *et al.*, 2015; Galeano *et al.*, 2016; García *et al.*, 2016; Petrova *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016; Tytgat *et al.*, 2016).

BAL como las aquí identificadas, se aplican cada vez más, en distintos aspectos de la producción animal y su uso se ha convertido en objeto de estudio tanto en la industria alimenticia como farmacológica, cobrando cada día mayor interés (Laulund *et al.*, 2017; Vimont *et al.*, 2017). El desarrollo de este tipo de producto en el campo farmacológico obedece mayormente a la necesidad de sustituir el empleo de antibióticos convencionales en la eliminación de microorganismos patógenos, mantener un buen balance en la microbiota del tracto gastrointestinal, reduciendo así enfermedades gastrointestinales frecuentes y modular el sistema inmunitario (Dimitrijević *et al.*, 2009; García Hernández & Pérez Sánchez, 2015).

Los PAs se identificaron por espectrometría de masa y posterior ingreso de las secuencias a la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) tal como lo hicieron Sahoo *et al.* (2015) y Oliveira *et al.* (2017). El péptido 81 fue el único que presentó una identidad compatible (100 %) con bacteriocina, en este caso coincidente con *Rhamnosin A*. Se sabe que esta bacteriocina es de clase II, caracterizándose por ser un péptido pequeño, estable al calor, digerible por enzimas proteolíticas (como presentes en el tracto gastrointestinal), de punto isoeléctrico altamente básico, sugestivo de una topografía de superficie catiónica y que contiene nonlathionina (Dimitrijević *et al.*, 2009). Similar respuesta antimicrobiana del péptido 81 frente a *S. aureus*, fue obtenida por Jeong & Moon (2015), a partir de la bacteriocina *Rhamnocin* 519 producida por *L. rhamnosus* CJNU 0519. Esta bacteriocina sostuvo además, accionar antimicrobiano sobre *L. acidophilus* y *Listeria monocytogenes*. También Oliveira *et al.* (2017) demostraron el accionar antimicrobiano de una bacteriocina producida por *L. rhamnosus* L156.4 frente a *S. aureus* como así también *E. coli* enteropatógena, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y otras bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esto sugeriría que el accionar de la bacteriocina en estudio podría extenderse también sobre otros microorganismos. Lin *et al.*, (2015) si bien no identificaron la bacteriocina producida por *L. rhamnosus* HN001, comprobaron la capacidad de inhibición del crecimiento y la formación de biofilm de *Streptococcus mutans*, al ser tratados por sobrenadantes de esta cepa. Dentro de los últimos avances ha sido patentada una bacteriocina producida por la cepa de *L. rhamnosus* KO1. Esta bacteriocina tiene alta resistencia

al calor, amplio espectro antimicrobiano y es menos probable que produzca microorganismos resistentes (Nikawa, 2016).

Si bien los otros tres péptidos no manifestaron una identidad compatible con bacteriocina, sí lo hicieron con proteínas relacionadas a la biosíntesis de bacteriocinas (Noda *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos arrojaron que el péptido 59 (identidad del 100 %) respondió a la proteína de inmunidad a bacteriocina *Brevicin* 174A, la que ha sido reportada por Noda *et al.* (2015) como un factor de auto-resistencia del *L. brevis*. Este no sería un caso aislado ya que existen otros reportes de péptidos que actúan como factores de inmunidad que se generan simultáneamente con las bacteriocinas (Wang *et al.*, 2013; Kristiansen *et al.*, 2016; Ghequire *et al.*, 2017). Las BAL productoras de bacteriocinas poseen en el mismo operón del gen de la bacteriocina, un gen que codifica para la proteína de inmunidad, la cual cumple con la función de proteger a la misma BAL productora de su bacteriocina (Kristiansen *et al.*, 2016). Si bien en este trabajo no fue detectada la bacteriocina *Brevicin* 174A, es de esperar que su producción se dé en simultáneo con la proteína de inmunidad. Se sabe que el *L. brevis* da origen a dos polipéptidos designados *Brevicin* 174A- $\beta$  y 174A- $\gamma$ . Aunque cada polipéptido muestra individualmente un efecto antibacteriano, la capacidad se incrementa 100 veces mezclando ambos polipéptidos en una proporción de 1: 1. Esta mezcla incluso ha logrado inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas a concentraciones más bajas que cuando se utiliza Nisina A. *Brevicin* 174A inhibe el crecimiento de *S. aureus* entre otros patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*), es termorresistente y se anula la actividad antibacteriana cuando es tratada con proteinasa K (Noda *et al.*, 2015).

El péptido 90 alineó en un 57 % con una proteína asociada a bacteriocina de *E. faecium*, sosteniendo una identidad del 85 %. Se conoce que existen seis genes implicados en la patogenidad de los enterococos que codifican para bacteriocina, y otras proteínas asociadas a la bacteriocina como pueden ser adhesina de pared celular, la citolisina y la gelatinasa. Es de destacar que los enterococos son conocidos por producir ácidos orgánicos y bacteriocinas múltiples (Nes *et al.*, 2007). Sin embargo no todas las cepas codifican para las mismas proteínas. Vimont *et al.* (2017), compara a *E. faecium* L50, poseedor de una adhesina de pared celular (efaAfm) y una feromona sexual, con *E. faecium* SF68 y *E. faecium* LCW 44, los cuales no contienen los genes de virulencia probados o el gen para la sustancia de agregación. Esto tornaría a estas dos últimas cepas en buenos candidatos para el uso de probióticos en animales o seres humanos, aunque se espera que los mecanismos de conjugación estén limitados por la ausencia

de sustancias de agregación. También informaron que *E. faecium* LCW 44 además de producir bacteriocinas podría liberar otras sustancias antimicrobianas contra *Listeria*. Aspri *et al.* (2017), a partir de leche de burro, aislaron tres cepas de *Enterococcus faecium* que mostraron actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. El análisis de espectrometría de masas demostró que los PAs respondieron a enterocinas A y B. Al igual que en este estudio, los ELC de los enterococos productores de bacteriocinas fueron activos en una amplia gama de tratamientos de pH y calor, lo que los torna en excelentes candidatos para aplicaciones potenciales en bio-preservación.

El péptido 108 sostuvo una identidad probable del 58 % con el péptido ABC transportador de escisión / exportación de bacteriocina de *L. brevis*. La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se sintetizan inicialmente como pre-péptidos con una extensión N-terminal (péptidos líderes). Generalmente, los péptidos precursores que contienen un líder tipo doble de glicina son procesados por un transportador ABC (ATP-binding cassette). El transportador ABC y una proteína accesoria conducen a la escisión de pre-péptido inactivo con la exportación concomitante del péptido maduro a través de la membrana citoplasmática (Pal & Srivastava, 2015).

La existencia de accionar inhibitorio del crecimiento microbiano por parte de las muestras que contenían estos 3 últimos PAs, amerita futuras experimentaciones que permitan detectar las sustancias causantes de tal acción, ya sean del tipo bacteriocinas u otros PAs como ya han sido informados para esas BAL (Trivedi *et al.*, 2014; Gautam *et al.*, 2014; Vasilchenko *et al.*, 2016; Geldart & Kaznessis, 2017).

En lo que respecta a los patrones de inhibición del crecimiento bacteriano de los péptidos, se comprobó la incapacidad de inhibición de los mismos en el 50 % y el 90 % de la población bacteriana (CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente) como sí lo habían logrados los ATMs, por lo que fueron calculadas las CIM<sub>35</sub> (35 % de inhibición si fue conseguido por todos los péptidos). Las CIM<sub>35</sub> de los cuatro péptidos fueron superiores a las CIM<sub>35</sub> y CIM<sub>50</sub> de los ATMs probados. La CIM<sub>35</sub> de los péptidos 59 (< 1,294 µg/ml) y 90 (< 1,930 µg/ml) fueron inferiores a las CIM<sub>90</sub> de gentamicina (< 2,00 µg/ml), ampicilina (< 4,00 µg/ml) y penicilina (< 4,00 µg/ml), la del péptido 108 (< 3,613 µg/ml) sólo fue inferior a la de ampicilina y penicilina y la del péptido 81 (< 4,100 µg/ml) fue superior a la de todos los ATMs.

Aun cuando los péptidos en ningún caso lograron una inhibición del crecimiento del 100 %, para los casos del 59, 90 y 108 alcanzaron un porcentaje mayor de inhibición respecto del 81

que sólo logró inhibir un 36,96 %. Un detalle importante a tener en cuenta es que del total de cepas de *S. aureus* (46), las dos que fueron resistentes a penicilina, se inhibieron ante los cuatro péptidos.

Según lo expuesto, la capacidad antimicrobiana de los péptidos es considerablemente inferior que la de los ATMs convencionales. No obstante, el sostenido aumento de la resistencia y su propagación despiertan interés para su estudio (Justiniano Mejía & Mejía Delgado, 2013; Premkumar, 2016). En este sentido, a nivel mundial existen reportes del accionar antimicrobiano a través de mediciones de CIM individuales de péptidos, combinados con otros péptidos, ATMs u otras moléculas buscando probables sinergismos (Ebbensgaard *et al.*, 2015; Heckler, 2015; Chaudhari *et al.*, 2016; Fuscaldi *et al.*, 2016; Miyoshi *et al.*, 2016).

También se reportan hidrólisis *in vitro* de proteínas alimentarias de origen animal (leche, huevo y algunas especies marinas de peces) o de hidrolizados limitados proteicos de origen vegetal (soya y maíz), desde los cuales se han aislado PAs (Acevedo Fernández *et al.*, 2013). Un ejemplo de ello lo constituyen Borjórquez-Balam, *et al.* (2013) que evaluaron *in vitro* la actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas < 10 kDa de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) contra los microorganismos *S. aureus* (Gram positivo) y *Shigella flexneri* (Gram negativo). Todas estas estrategias ayudarán al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Tal como se expresó anteriormente, sólo el ELC 81 demostró la presencia de una bacteriocina y en los tres casos restantes las técnicas empleadas no lo consiguieron. No obstante, sí lo hicieron con proteínas relacionadas a la biosíntesis de bacteriocinas, cuyas presencias se suponen concomitantes con la de las bacteriocinas. Ya que las fortalezas de los PAs radican en su amplio espectro de actividad bactericida, rápida acción y baja tendencia para desarrollar resistencia (Tonarelli & Simonetta, 2014), el hecho de haber manifestado actividad antimicrobiana por parte de los ELC, implicaría a futuro, estudios más exhaustivos que conlleven a una identidad más precisa de los péptidos causantes de la inhibición microbiana. Si se comparan los PAs con los ATMs, estos poseen escasa selectividad, reducida actividad en presencia de sales y de cationes divalentes, son sensibles a los cambios de pH, a las proteasas y a otros componentes plasmáticos. En función de estas limitantes existe la necesidad de proyectar alternativas, para que puedan ser utilizados como agentes terapéuticos sistémicos.

Normalmente, una vez identificado un péptido natural activo, se suele generar alguna modificación en la secuencia del mismo para conseguir una mayor eficacia. Actualmente el

diseño de moléculas se piensa en función de conseguir la mayor especificidad posible hacia componentes de las membranas de células procariotas pero a la vez con mínima toxicidad hacia las membranas eucariotas; además de tratar de lograr que sea lo más estable posible frente a distintas variables (Sánchez, 2016).

La incorporación de técnicas de espectrometría de masas han resultado ser de mucha utilidad para el secuenciamiento de estos péptidos (Sahoo *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de PAs permitirá a futuro, realizar su síntesis química y disponer de cantidades superiores de esta proteína y así concretar los estudios indispensables para su completo conocimiento. Por ejemplo, lograr concentraciones adecuadas para poder efectuar la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> y hacer un valoramiento certero respecto de los ATMs conocidos, evaluar el grado de sinergia que se puede establecer al combinarlos con otros ATMs, además de proyectar probables modificaciones en la molécula para mejorar su eficacia de acción como lo es su habilidad para destruir bacterias multirresistentes. Por lo tanto comprender las relaciones que existen entre la estructura y la actividad de los PAs es esencial para el diseño y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, con mejores propiedades.

Este trabajo ha aportado los primeros datos departamentales inherentes a las IIM a *S. aureus* (salud animal, prevalencia de mastitis, etc.). También ha permitido identificar las cepas de *S. aureus* representantes de la región y describir la actividad de los ATMs y los PAs frente a estas cepas. Desde el punto de vista epidemiológico, el análisis de distribución de las cepas inhibidas dejó expuesto que existiría resistencia variable a distintos ATMs. Será categórico entonces que los resultados obtenidos, se constituyan en una base para el seguimiento de la resistencia a estos agentes en la región y en el tiempo, generando patrones de resistencia representativos. Pruebas *in vitro* de susceptibilidad como las aquí concretadas, si bien no se corresponden necesariamente con las respuestas *in vivo*, sumados a futuros trabajos farmacocinéticos permitirán adecuar los ajustes posológicos correctos para que la terapia con ATM sea eficaz en el animal. Pero también, el análisis de la eficacia *in vitro* de PAs marca un comienzo en la prueba de ensayos de terapias alternativas que puedan favorecer al control de la mastitis bovina ocasionada por *S. aureus*, tendiendo a una disminución paulatina del uso de ATMs.



## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

---

- El 5,9 % de las vacas presentaron signos clínicos de IIM en al menos uno de los cuartos y el 63 % de los RCS fueron superiores al punto de corte de 200.000 cél/ml. La prevalencia de mastitis causada por *S. aureus* en vacas en período de lactancia en el departamento Río segundo, Córdoba, fue del 11,8 % (4,1 % y 7,7 %, mastitis clínica y subclínica, respectivamente).
- De la categorización de los tambos surge que a mejores condiciones generales, hubo mayor producción lechera, menor exposición de factores de riesgo y por ende menor prevalencia específica de IIM por *S. aureus*.
- Sólo tres tambos se correspondieron a la categoría de “precarios” siendo los responsables del aporte del 47,6 % de los casos de mastitis por *S. aureus*. Los factores predisponentes a la presencia de mastitis se manifestaron prioritariamente en estos tambos.
- Tanto a nivel departamental (76,3 %) como en cada categoría de tambos, el factor de riesgo de mastitis que se presentó con mayor proporción fue el no apartar vacas con mastitis clínica de las líneas de ordeño, priorizándose así alcanzar un determinado caudal de producción en detrimento de la calidad de la leche y la salud animal. Le siguió en jerarquía de proporción, la inexistencia de un orden de ingreso de los animales a la sala de ordeño en un mismo rodeo.
- En la totalidad de los tambos precarios, además, no se empleaba CMT para mastitis subclínica, el personal no contaba con la capacitación técnica, ni usaban guantes en el ordeño y los cambios de pezoneras no seguían las indicaciones del fabricante. El resto de los factores predisponentes de mastitis se sostuvieron para estos tambos en el orden del 66,7 %. El riesgo de presentar IMM a *S. aureus* en los tambos precarios fue 4,9 veces mayor respecto a los animales del resto de los tambos, siendo el 37,9 % de su prevalencia atribuible específicamente a las condiciones de precariedad.
- Las vacas que se ordeñaban manualmente demostraron tener 12,17 más probabilidades de presentar IIM por *S. aureus* respecto a aquellas ordeñadas mecánicamente, siendo este el factor

de riesgo con mayor asociación significativa ( $p < 0,05$ ), independientemente de la categorización de tambos.

- De la evaluación de las asociaciones entre los factores de riesgo con la presencia de IIM por *S. aureus*, mediante un modelo mixto lineal generalizado (intercepción aleatoria: “tambo muestreado”), se concluye que la pertenencia del individuo a un tambo con ordeño manual tiene 6,95 más probabilidades de presentar una IIM a *S. aureus* y triplica las posibilidades cuando el personal del tambo no está capacitado.
- Existe la necesidad de sostener medidas de manejo de los rodeos y de planificar estrategias tanto para la detección a tiempo, como para el control de los factores de riesgo lo que se traducirá en ubres sanas y calidad de producción lechera.
- Cada uno de los seis ATMs que se utilizaron en este trabajo, sostuvo patrones de susceptibilidad / resistencia particulares. La oxitetraciclina consiguió la inhibición del 100 % de las cepas de *S. aureus* a diluciones más bajas, seguido por tilosina y gentamicina. A una concentración mayor lo hizo cloxacilina y ampicilina, no consiguiéndolo penicilina, al menos, en el rango de diluciones empleado.
- De la confrontación de las diluciones máximas necesarias para la inhibición total del crecimiento microbiano con los puntos de corte clínico de CLSI surge que el 100 % de las cepas de *S. aureus* se inhibieron ante oxitetraciclina, gentamicina y tilosina en valores de concentración inferiores a los puntos de corte indicativos de resistencia. Sin embargo, para gentamicina y tilosina hubo un 4 % y 13 %, respectivamente, de cepas que lo hicieron en valores de concentración intermedios entre los puntos de corte de sensibilidad y resistencia. Manifestaron resistencia ante cloxacilina (2,2 %), ampicilina (37 %) y penicilina (46 %).
- La oxitetraciclina, gentamicina, tilosina, ampicilina y penicilina demostraron resistencia (2,2 %, 13 %, 9 %, 37 % y 46 %, respectivamente) con respecto a los puntos de corte clínicos de EUCAST (2015). Los seis ATMs manifestaron resistencia con respecto a los puntos de corte epidemiológicos EUCAST (2015), siendo penicilina la que obtuvo la mayor proporción (46 %).
- La penicilina fue incapaz de inhibir al 4,35 % de las cepas de *S. aureus*. Respecto de los puntos de corte clínicos propuestos por EUCAST (2015) y CLSI (2013) reveló una resistencia del 45,65 % y 32,61 %, respectivamente, y también fue superior al punto de corte epidemiológico (EUCAST).
- La oxitetraciclina manifestó una CIM<sub>90</sub> por debajo de los puntos de cortes clínicos y epidemiológicos por CLSI (2013) y EUCAST (2015).

- La cloxacilina tuvo un alto número de cepas inhibidas a diluciones bajas. Su CIM<sub>90</sub> fue inferior al punto de corte clínicos de CLSI, sin embargo fue superior al epidemiológico (EUCAST).
- La tilosina tuvo un alto número de cepas inhibidas a diluciones bajas. Su CIM<sub>90</sub> se mantuvo por debajo de los puntos de cortes clínicos y epidemiológicos por CLSI (2013) y EUCAST (2015).
- La gentamicina logró inhibir todas las cepas de *S. aureus* pero manifestó la existencia de al menos dos subpoblaciones con diferente sensibilidad. Su CIM<sub>90</sub> fue superior al punto de corte clínico de EUCAST (resistencia del 12,5 %) e inferior respecto del punto de corte clínico de CLSI y del epidemiológico de EUCAST.
- La ampicilina sostuvo una población salvaje sensible a bajas diluciones y subpoblaciones que necesitaron de diluciones más altas para su inhibición. Un alejamiento entre su CIM<sub>90</sub> y CIM<sub>50</sub> sugirió una tendencia a la resistencia. Su CIM<sub>90</sub> fue superior a los puntos de corte clínicos de EUCAST y CLSI, denotando una resistencia del 37 % respecto de ambos casos, como así también fue superior al punto de corte epidemiológico propuesto por EUCAST.
- Las CIM<sub>90</sub> de penicilina, ampicilina y cloxacilina fueron superiores al punto de corte epidemiológico (EUCAST). Si bien no fue indicativo de resistencia, expresó una sensibilidad acotada.
- Pruebas *in vitro* de susceptibilidad como esta, sumados a futuros trabajos farmacocinéticos permitirán adecuar los ajustes posológicos correctos para que la terapia con ATM sea eficaz en el animal. Generar a futuro la determinación de puntos de corte clínicos específicos para *S. aureus* de la región, la normalización de los métodos para determinar los valores de CIM, así como estudios moleculares (PCR) para la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *S. aureus*, permitirá hacer modificaciones farmacológicas para recuperar la sensibilidad de los antibacterianos y con ello contrarrestar la ineficacia producto del desarrollo de resistencia.
- Las identificaciones genotípicas de los cuatro aislamientos bacterianos respondieron a *L. rhamnosus* (aislamiento 81), *L. brevis* (aislamientos 59 y 108) y *E. faecium* (aislamiento 90).
- El PA 81 fue el único que presentó una identidad compatible con la bacteriocina *Rhamnosin A*. Los otros tres PAs manifestaron una identidad compatible con proteínas relacionadas a la biosíntesis de bacteriocinas. El PA 59 respondió a la proteína de inmunidad a bacteriocina *Brevicin 174A*. El PA108 sostuvo una identidad compatible con el péptido ABC

transportador de escisión / exportación de bacteriocina de *L. brevis*. El PA 90 alineó con una proteína asociada a bacteriocina de *E. faecium*.

- Los PAs demostraron incapacidad de inhibición del crecimiento en el 50 % y el 90 % de la población bacteriana. Las CIM<sub>35</sub> de los cuatro PAs fueron superiores a las CIM<sub>35</sub> y CIM<sub>50</sub> de los ATMs probados. La CIM<sub>35</sub> de los PAs 59 y 90 fueron inferiores a las CIM<sub>90</sub> de gentamicina, ampicilina y penicilina; la del PA 108 sólo fue inferior a la de ampicilina y penicilina y la del PA 81 fue superior a la de todos los ATMs. Los PAs 59, 90 y 108 alcanzaron un porcentaje mayor de inhibición respecto del 81. Las dos cepas de *S. aureus* que fueron resistentes a penicilina, se inhibieron ante los cuatro PAs.
- La manifestación de actividad antimicrobiana, implicaría a futuro, estudios más exhaustivos que conlleven el acercamiento a una identidad más precisa de los PAs.
- A pesar de las limitantes que puedan poseer los PAs, sus fortalezas ameritan su estudio para proyectarlos como alternativas de uso a los agentes terapéuticos tradicionales. Comprender las relaciones que existen entre la estructura y la actividad de los PAs es esencial para el diseño y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, con mejores propiedades.
- Los resultados aquí obtenidos han aportado los primeros datos departamentales inherentes a las IIM a *S. aureus* (salud animal, prevalencia de mastitis, etc.).
- Este trabajo ha permitido identificar las cepas de *S. aureus* representantes de la región y describir la actividad de los ATMs y los PAs frente a estas cepas.
- Los resultados de CIM logrados constituyen una base para el seguimiento de la resistencia a estos agentes en la región y en el tiempo, generando patrones de resistencia representativos.
- El análisis de la eficacia *in vitro* de PAs marca un comienzo en la prueba de ensayos de terapias alternativas que puedan favorecer al control de la mastitis bovina ocasionada por *S. aureus*, tendiendo a una disminución paulatina del uso de ATMs.

## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. ACEVEDO FERNÁNDEZ, J. J.; ANGELES CHIMAL, J. S.; RIVERA, H. M.; PETRICEVICH LÓPEZ, V. L.; NOLASCO QUINTANA, N. Y.; COLLÍ MAGAÑA, D. Y. & SANTA-OLALLA TAPIA, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos. *OmniaScience Monographs*, Norteamérica, enero de 2013. Disponible en internet: <http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/38/6>. Consultado: 02 de marzo de 2017.
2. ADAMIAK, M.; ABDELBASET-ISMAIL, A.; MOORE, J. B.; ZHAO, J.; ABDEL-LATIF, A.; WYSOCZYNSKI, M. & RATAJCZAK, M. Z. (2017). Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Is a Novel Negative Regulator of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Trafficking. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 92-103.
3. AGRIMUNDO. (2015). Argentina: USDA prevé un leve aumento de la producción lechera para este año. Disponible en internet: <http://www.agrimundo.cl/?tag=lacteos-1>. Consultado: 05 de febrero de 2017.
4. AGUILAR, C. & KLOTZ, B. (2011). Producción de sustancias BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances): una alternativa de biocontrol en la industria alimentaria. *Alimentos Hoy*, 13(13), 27-34.
5. ALERTE, V.; CORTÉS, S.; DÍAZ, J.; VOLLAIRE, J.; ESPINOZA, M.; EUGENIA, M. & TORRES, M. (2012). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Revista chilena de infectología*, 29(1), 26-31.
6. ALFALEH, K.; ANABREES, J.; BASSLER, D. & AL-KHARFI, T. (2012). Cochrane Review: Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, 7(6), 1807-1854.
7. ALÓS, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.

8. ALTA. (2012). ¿Cómo se desarrolla la mastitis en la ubre? Básicos Lecheros. Disponible en internet: [http://web.altagenetics.com/espanol/DairyBasics/Details/3015\\_Como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre.html](http://web.altagenetics.com/espanol/DairyBasics/Details/3015_Como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre.html). Consultado: 05 de febrero de 2017.
9. ALVARADO OSUNA, C. (2007). Identificación y cuantificación de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos artesanales mexicanos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro, México. Disponible en internet: <http://ri.uaq.mx/handle/123456789/2861>. Consultado: 15 de febrero de 2017.
10. ÁLVAREZ-CALATAYUD, G.; SUÁREZ, E.; RODRÍGUEZ, J. M. & PÉREZ-MORENO, J. (2015). La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 56-61.
11. ANDRESEN, H., (2012). Otras medidas: Erradicación de *S. agalactiae*, vacunaciones. Vacunación contra mastitis. *Perulactea*, 3(7).
12. ASLANTAŞ, Ö. & DEMIR, C. (2016). Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8607-8613.
13. ASLI, A.; BROUILLETTE, E.; STER, C.; GHINET, M. G.; BRZEZINSKI, R.; LACASSE, P. & MALOUIN, F. (2017). Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PloS one*, 12(5), p. e0176988. Disponible en internet: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176988>. Consultado: 06 de febrero de 2017.
14. ASPRI, M.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C. & PAPADEMAS, P. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73, 1-9.
15. BACHMANN, H.; MOLENAAR, D.; BRANCO DOS SANTOS, F. & TEUSINK, B. (2017). Experimental evolution and the adjustment of metabolic strategies in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, fux024.
16. BARBERIO, A.; FLAMINIO, B.; DE VliegHER, S.; SUPRE, K.; KROMKER, V.; GARBARINO, C. & CATANIA, S. (2016). Short communication: in vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. *J. Dairy Sci*, 99, 6578-6584.

17. BARRERA, J. C. H.; MERCHÁN, M. A.; SÁNCHEZ, D. A. B. & QUIROGA, C. F. P. (2015). Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*, 2(2), 162-176.
18. BENAVIDES, T. C.; BRIZ, M. T. G.; LÓPEZ, J. I. M.; TORRES, G. L.; DELGADO, M. E. R. & GARCÍA, L. A. (2015). Alimentos funcionales en la tercera edad: Probióticos y prebióticos ¿Qué hay de cierto? *Salud y cuidados en el envejecimiento Volumen III*, 83.
19. BENNETT, J. V.; BRODIE, J. L.; BENNER, E. J. & KIRBY, W. M. (1966). Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied microbiology*, 14(2), 170-177.
20. BERRY, A. C.; LEARNED, M.; GARLAND, J.; BERRY, L.; RODRIGUEZ, S.; SCOTT, B. & BERRY, B. B. (2017). Intensive Care Unit Probiotic Utilization Rates: When Committee Recommendations and Physician Utilization Diverge. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 1-2.
21. BERRY, E. (2014). Guidelines for the use and interpretation of bovine milk somatic cell counts (SCC) in the dairy industry. IDF/ICAR (International Dairy Federation/ International Committee for Animal Recording). Disponible en internet:  
<http://www.idfdairylaboratories.org/Files/media/newsletter5RefsysSCC-IDF-ICAR.pdf>.  
 Consultado: 30 de enero de 2017.
22. BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C. & RAY, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 261-268.
23. BORJÓRQUEZ-BALAM, E.; RUIZ RUIZ, J. C.; SEGURA-CAMPOS, M.; BETANCUR ANCONA, D. & CHEL GUERRERO, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *OmniaScience Monographs*. Disponible en internet:  
<http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/96/10>.  
 Consultado: 07 de marzo de 2017.
24. BOUCHARD, D. S.; SERIDAN, B.; SARAoui, T.; RAULT, L.; GERMON, P.; GONZALEZ-MORENO, C. & CHAIN, F. (2015). Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *PloS one*, 10(12), e0144831.

25. BRADFORD M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
26. BUTLER, C.; DUNCAN, D. & HOOD, K. (2012). Prevention of diarrhea associated with the use of oral antibiotics. *BMJ*, 344, 682.
27. CALDERÓN A. & RODRÍGUEZ V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el Altiplano Cundiboyacence (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4), 582-589.
28. CALDERÓN RANGEL, A.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, V. C.; ARRIETA BERNATE, G. J. & MÁTTAR VELILLA, S. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antibacteriana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 19-28.
29. CALVINHO, L. & TIRANTE, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 4(1/2), 29-40.
30. CALVINHO, L. F.; TOSELLI, F. G.; WEIMANN, W. R.; CANAVESIO, V. R.; NEDER, V. E. & IGUZQUIZA, I. A. (2002). Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de estafilococos coagulasa positivos aisladas de mastitis bovina en la cuenca lechera central de la Argentina. *Producción Animal, Sanidad*, 2003.
31. CAMUSSONE, C. & CALVINHO, L. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 119-130.
32. CAMUSSONE, C. (2013). Desarrollo de un inmunógeno prototípico para el control de mastitis bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*. Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. *FABICIB*, 18, 230-232.
33. CANUT, A. & MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2014). Puntos de corte de ceftarolina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 21-26.
34. CÁRCAMO-ARÉCHIGA, N.; GRIJALVA-CHON, J. M.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VARELA-ROMERO, A.; LÓPEZ-TORRES, M. A. & MEDINA-JUÁREZ, L. Á. (2016). Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una



- revisión/Defense mechanisms of penaeid shrimp during the infective process: a review. *Biotecnia*, 18(1), p. 32-42.
35. CARRO, M. D.; SARO, C.; MATEOS, I.; DÍAZ, A. & RANILLA, M. J. (2014). Empleo de probióticos En la alimentación de Rumiantes. Editorial Agrícola Española SA Ganadería, 93, 42-49.
  36. CASTELANI, L.; PILON, L. E.; MARTINS, T.; POZZI, C. R. & ARCARO, J. R. P. (2015). Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Animal Science Journal*, 86(3), 340-344.
  37. CASTRO, L. & DE ROVETTO, C. (2013). Probióticos: utilidad clínica. Biblioteca Digital Universidad del Valle. Disponible en internet:  
<http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/4783>. Consultado: 20 de febrero de 2017.
  38. CEOTTO, H.; DOS SANTOS NASCIMENTO, J.; DE PAIVA BRITO, M. A. V. & DE FREIRE BASTOS, M. D. C. (2009). Bacteriocin production by *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis in Brazil. *Research in microbiology*, 160(8), 592-599.
  39. CERVANTES-GARCÍA, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. & SALAZAR-SCHETTINO, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
  40. CHAUDHARI, A. A.; DEB NATH, S.; KATE, K.; DENNIS, V.; SINGH, S. R.; OWEN, D. R. & PILLAI, S. R. (2016). A novel covalent approach to bio-conjugate silver coated single walled carbon nanotubes with antimicrobial peptide. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), 58.
  41. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- Second Informational Supplement, 32(3), CLSI document M100-S21.
  42. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23.
  43. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO – ANMAT. (2017). Capítulo XVII-Alimentos de régimen o dietéticos. Disponible en internet:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_XVII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVII.pdf). Consultado: 04 de febrero de 2017.

44. COMINIELLO, S. (2016). La revolución del ordeño: Cambios en el proceso de trabajo de la producción primaria de leche en Argentina, 1980: 2007. Trabajo y sociedad, 26, 361-387.
45. CRAVERO, B. F.; DE PENDINI, M. C.; PENDINI, M. & CERULLI, R. (1989). Conteo celular somático en leche total de rodeos lecheros de la provincia de Córdoba: relación con las fluctuaciones estacionales de producción y su repercusión en la detección de la salud mamaria. 2das Jor. Int. Calidad de Leche (JICAL II). Buenos Aires, 17.
46. CREDITO, K.; KOSOWSKA-SHICK, K. & APPELBAUM, P. C. (2010). Mutant prevention concentrations of four carbapenems against gram-negative rods. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(6), 2692-2695.
47. CRUCHET, S.; FURNES, R.; MARUY, A.; HEBEL, E.; PALACIOS, J.; MEDINA, F. & XÓCHIHUA, L. (2015). The use of probiotics in pediatric gastroenterology: a review of the literature and recommendations by Latin-American experts. Pediatric Drugs, 17(3), 199-216.
48. CUENCA-ESTRELLA, M.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; GÓMEZ-LÓPEZ, A. & MONZÓN, A. (2013). Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 31, 53-58.
49. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. & WOOD JR, W. B. (1968). Principles of microbiology and immunology. Principles of microbiology and immunology. Disponible en internet:  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19692704196>. Consultado: 15 de febrero de 2017.
50. DEL COCO, V. (2015). Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. Revista Argentina de Microbiología, 47(3), 171-173.
51. DELUCCHI, L.; FRAGA, M. & ZUNINO, P. (2017). Effect of the probiotic *Lactobacillus murinus* LbP2 on clinical parameters of dogs with distemper-associated diarrhea. Canadian Journal of Veterinary Research, 81(2), p. 118-121.
52. DIMITRIJEVIĆ, R.; STOJANOVIĆ, M.; ŽIVKOVIĆ, I.; PETERSEN, A.; JANKOV, R. M.; DIMITRIJEVIĆ, L. & GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ, M. (2009). The identification of a low molecular mass bacteriocin, *rhamnosin A*, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. Journal of applied microbiology, 107(6), 2108-2115.
53. DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICAS Y CENSOS DE LA PROVINCIA DE CORDOBA. (2015). Lechería. Disponible en internet:

- <http://estadistica.cba.gov.ar/Economia/SectorPrimario/Lecheria/tabid/158/language/es-AR/Default.aspx>. Consultado: 27 de enero de 2017.
54. DU PREEZ, J. H. (2000). Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 67(4), 263-271.
  55. EBBENGAARD, A.; MORDHORST, H.; OVERGAARD, M. T.; NIELSEN, C. G.; AARESTRUP, F. M. & HANSEN, E. B. (2015). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PloS one*, 10(12), e0144611.
  56. ECHEVARRIA ZARATE, J. & IGLESIAS QUILCA, D. (2013). Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana*, 14(4), 195-203.
  57. EKMAN, T. & ØSTERÅS, O. (2003). Mastitis control and dry cow therapy in the Nordic countries. Annual meeting-national mastitis council incorporated. National Mastitis Council; 1999, 18-30.
  58. ESPARZA, G.; ARIZA, B.; BEDOYA, A. M.; BUSTOS, I.; CASTAÑEDA-RAMIREZ, C. R.; DE LA CADENA, E. & MELÉNDEZ, M. P. (2013). Estrategias para la implementación y reporte de los puntos de corte CLSI vigentes y pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y carbapenemasas en bacilos Gram negativos en laboratorios clínicos de Colombia. *Infectio*, 17(2), 80-89.
  59. ESPECHE, M. C.; OTERO, M. C.; SESMA, F. & NADER-MACIAS, M. E. F. (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary microbiology*, 135(3), 346-357.
  60. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2015. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Disponible en internet: <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=14>. Consultado: 20 de febrero de 2017.
  61. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2016. Cloxacillin / *Staphylococcus aureus*. International MIC distribution. Reference database 2016-08-24.

- Disponible en internet: [http://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=5362#histogram\\_data](http://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=5362#histogram_data). Consultado: 20 de febrero de 2017.
62. FAGGIO, C.; PAGANO, M.; ALAMPI, R.; VAZZANA, I. & FELICE, M. R. (2016). Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 180, 258-265.
  63. FAO (Food and Agricultural Organization). (2016). Producción lechera. Boletín informativo. Disponible en internet: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/>. Consultado: 27 de enero de 2017.
  64. FAO/OMS (Food and Agricultural Organization/ Organización Mundial de la Salud). (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición, 85. Disponible en internet: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>. Consultado: 27 de enero de 2017.
  65. FARCI, D.; ESPOSITO, F.; EL ALAOUI, S. & PIANO, D. (2016). S-layer proteins as a source of carotenoids: Isolation of the carotenoid cofactor deinoxanthin from its S-layer protein DR\_2577. *Food Research International*.
  66. FERNÁNDEZ BOLAÑOS, O. F.; TRUJILLO GRAFFE, J. E.; PEÑA CABRERA, J. J.; CERQUERA GALLEGO, J. & GRANJA SALCEDO, Y. T. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista electrónica de Veterinaria, REDVET*, 3(11), 2.
  67. FERNÁNDEZ VILLA, K. J.; CHANCI ECHEVERRI, I. C.; WILCHES LÓPEZ, L.; ARIAS, C. & ANTONIO, J. (2014). Characterization of metabolites of lactic acid bacteria and inhibitory effect of bacteriocins on pathogenic microorganisms in foods: a systematic literature review, 2008-2012. *Biosalud*, 13(1), 45-61.
  68. FERRAN, A. A.; KESTEMAN, A. S.; TOUTAIN, P. L. & BOUSQUET-MÉLOU, A. (2009). Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3384-3390.
  69. FIL-IDF (International Dairy Federation). (2015). The World Dairy Situation 2015 is released at the IDF World Dairy Summit. Disponible en internet: <http://www.fil-idf.org/Public/PressRoomList.php?ID=28788&language=spa>. Consultado: 27 de febrero de 2017.

70. FUKAO, M.; OSHIMA, K.; MORITA, H.; TOH, H.; SUDA, W.; KIM, S. W. & YAJIMA, N. (2013). Genomic analysis by deep sequencing of the probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 harboring nine plasmids reveals genomic stability. PLoS One, 8(3), e60521.
71. FULLER, R. (1989). A review: Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology, 66, 365-378.
72. FUSCALDI, L. L.; DOS SANTOS, D. M.; PINHEIRO, N. G. S.; ARAÚJO, R. S.; DE BARROS, A. L. B.; RESENDE, J. M. & CARDOSO, V. N. (2016). Synthesis and antimicrobial evaluation of two peptide LyeTx I derivatives modified with the chelating agent HYNIC for radiolabeling with technetium-99m. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 22(1), 16.
73. GALEANO, J.; HERRERA, A. & SUESCÚN, J. (2016). The probiotic *Enterococcus faecium* modifies the intestinal morphometric parameters in weaning piglets. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 69(1), 7803-7811.
74. GARCÍA HERNÁNDEZ, Y. & PÉREZ SÁNCHEZ T. (2015). Obtención de microorganismos con actividad probiótica para animales monogástricos. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba, 5(3 2015).
75. GARCIA, E. F.; LUCIANO, W. A.; XAVIER, D. E.; DA COSTA, W. C.; DE SOUSA OLIVEIRA, K.; FRANCO, O. L. & SAARELA, M. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. Frontiers in microbiology, 7.
76. GARCÍA, F. & DÍAZ M. (2011). Modelos mixtos generalizados para el estudio del desempleo en los grandes aglomerados urbanos de Argentina. Revista de Economía y Estadística, 49(1), 79-98.
77. GASQUE GÓMEZ, R. (2008). Mastitis bovina. Enciclopedia bovina, 1º edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 176-181.
78. GAUTAM, N.; SHARMA, N. & AHLAWAT, O. (2014). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* UN isolated from Dhulliachar: a traditional food product of north east India. Indian journal of microbiology, 54(2), 185-189.
79. GELDART, K.; & KAZNESSIS, Y. N. (2017). Characterization of Class IIa Bacteriocin Resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(4), e02033-16.

80. GENMIC (Genetics and Microbiology Research Group). (2007). Bacterias Gram-positivas fermentadoras: Bacterias del ácido láctico. Disponible en internet: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/20bacterias%20lacticas.htm>. Consultado: 29 de enero de 2017.
81. GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M. & DEGREGORIO, O. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. Journal of dairy science, 83(6), 1224-1227.
82. GERBALDO, G.; ASURMENDI, P.; RUIZ, F.; PASCUAL, L.; DALCERO, A. & BARBERIS, L. (2012). Control biológico in vitro por bacterias ácido lácticas aisladas de residuos de cervecería. Revista Bio Ciencias, 2(1).
83. GHEQUIRE, M.; KEMLAND, L. & DE MOT, R. (2017). Novel immunity proteins associated with colicin M-like bacteriocins exhibit promiscuous protection in *Pseudomonas*. Frontiers in microbiology, 8.
84. GIANNEECHINI, R.; CONCHA, C.; DELUCCI, I.; GIL, J.; SALVARREY, L. & RIVERO, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. Veterinaria, 50(193), 111-132.
85. GÓMEZ-QUISPE, O. E.; SANTIVÁÑEZ-BALLÓN, C. S.; ARAUCO-VILLAR, F.; ESPEZUA-FLORES, O. H. & MANRIQUE-MEZA, J. (2015). Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 26(1), 86-95.
86. GONZÁLEZ, R. N.; GIRAUDO, J. A. & BUSSO, J. J. (1980). Investigación en mastitis subclínicas. II Agentes etiológicos bacterianos. Rev. Med. Vet., Bs. As., 61, 225-234.
87. GONZÁLEZ-HEIN, G.; CORDERO, N.; GARCÍA, P. & FIGUEROA, G. (2013). Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. Revista chilena de infectología, 30(2), 135-139.
88. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E.; GÓMEZ-TREVIÑO, M. & JIMÉNEZ-SALAS, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2).
89. GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A. & FEDORAK, R. (2011). Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos, 1-29.

90. GUTIÉRREZ, F.; DÍAZ, M.; ARIAS, Y. & RODRÍGUEZ, E. (2015). Sensibilidad a agentes antimicrobianos de patógenos mastitogénicos aislados en leche de vacas doble propósito. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 32.
91. HAMID, S.; BHAT, M. A.; MIR, I. A.; TAKU, A.; BADROO, G. A.; NAZKI, S. & MALIK, A. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary world*, 10(3), 363.
92. HECKLER, C. (2015). Avaliação do efeito sinérgico de antimicrobianos naturais. Eventos UFRGS, XXVII Encontro de Iniciação Científica – 2015, Ciências Agrárias, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Brasil.
93. HERNÁNDEZ REYES, J. M. & BEDOLLA CEDENO, J. L. C. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Revista electrónica de Veterinaria, REDVET*, 9(9).
94. HERRERA, F. & SANTOS, J. (2015). Enterotoxigenic Genes in strains of *Staphylococcus* spp., isolated from cheese made in Pamplona-Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 20(1), 4472-4481.
95. HEUVELINK, A.; REUGEBRINK, C. & MARS, J. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Veterinary microbiology*, 189, 1-7.
96. HINCKLEY, L. S.; BENSON, R. H.; POST, J. E. & DECLOUX, J. C. (1985). Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(7), 709-711.
97. HOE, F. & RUEGG, P. (2006). Opinions and practices of Wisconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being. *Journal of dairy science*, 89(6), 2297-2308.
98. HOQUE, M. N.; DAS, Z. C.; TALUKDER, A. K.; ALAM, M. S. & RAHMAN, A. N. M. A. (2015). Different screening tests and milk somatic cell count for the prevalence of subclinical bovine mastitis in Bangladesh. *Tropical animal health and production*, 47(1), 79-86.
99. IMAGEJ. (2012). User Guide ImageJ/Fiji 1.46. Disponible en internet: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>. Consultado 17 de noviembre de 2016.
100. INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2011. Proyecto lechero: La leche en la Argentina. Disponible en internet: [http://www.caprolec.com.ar/noticia\\_ver.php?v\\_idarticulo=3368](http://www.caprolec.com.ar/noticia_ver.php?v_idarticulo=3368). Consultado 7 de febrero de 2017).

101. IRAGUHA, B.; HAMUDIKUWANDA, H. & MUSHONGA, B. (2015). Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 86(1), 1-6.
102. JEONG, Y. & MOON, G. (2015). Antilisterial Bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 Presenting a Narrow Antimicrobial Spectrum. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(1), 137.
103. JIMÉNEZ MARTÍNEZ, J. (2015). Evaluación y diseño de bacterias lácticas (BAL) de origen alimentario y de otros hospedadores como factorías celulares de producción de bacteriocinas. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, España.
104. JURADO-GÁMEZ, H. & GÚZMAN-INSUASTY, M. (2015). Determination of kinetic, tests and growth inhibition effect of *Lactobacillus casei* in vitro in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2), 23-39.
105. JUSTINIANO MEJÍA, M. & MEJÍA DELGADO, E. (2015). Efecto probiótico in vitro de *Actobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacina, imipenem y vancomicina sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *Pueblo continente*, 24(1), 186-202.
106. KESTEMAN, A. S.; FERRAN, A. A.; PERRIN-GUYOMARD, A.; LAURENTIE, M.; SANDERS, P.; TOUTAIN, P. L. & BOUSQUET-MÉLOU, A. (2009). Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4740-4748.
107. KRISTIANSEN, P. E.; PERSSON, C.; FUOCHI, V.; PEDERSEN, A.; KARLSSON, G. B.; NISSEN-MEYER, J. & OPPEGÅRD, C. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Structure and Mutational Analysis of the Lactococcin A Immunity Protein. *Biochemistry*, 55(45), 6250-6257.
108. KRÖMKER, V.; PFANNENSCHMIDT, F.; HELMKE, K.; ANDERSSON, R. & GRABOWSKI, N. T. (2012). Risk factors for intramammary infections and subclinical mastitis in post-partum dairy heifers. *Journal of dairy research*, 79(3), 304-309.
109. LÄHTEINEN, T.; LINDHOLM, A.; RINTTILÄ, T.; JUNNIKKALA, S.; KANT, R.; PIETILÄ, T. E. & PALVA, A. (2014). Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a



- feeding supplement on the performance and immune function of piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*, 158(1), 14-25.
110. LAULUND, S.; WIND, A.; DERKX, P. M. & ZULIANI, V. (2017). Regulatory and Safety Requirements for Food Cultures. *Microorganisms*, 5(2), 28.
  111. LILLY, D. M. & STILLWELL, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
  112. LIN, X.; CHEN, X.; CHEN, Y.; JIANG, W. & CHEN, H. (2015). The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral diseases*, 21(1).
  113. LOEZA ÁNGELES, H.; SAGRERO CISNEROS, E.; VILLAGÓMEZ GÓMEZ, E. & LÓPEZ MEZA, J. (2013). Actividad antibacteriana del medio condicionado de células endoteliales transfectadas con el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus*. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 10(1), 49-59.
  114. LONDOÑO, N. A.; TABORDA, M. T.; LÓPEZ, C. A. & ACOSTA, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186-205.
  115. LÓPEZ RODRÍGUEZ, J. (2014). Mamitis bovina: definición, etiología y epidemiología de la enfermedad. *Ciencia Veterinaria*. Disponible en internet: <http://cienciaveterinaria.com/mamitis-definicion-etilogia-y-epidemiologia/>. Consultado: 03 de febrero de 2017.
  116. LÓPEZ, M. & MARINO, J. (2015). Adición de *Bacillus Coagulans* (*Lactbacillus esporogenes*) a una Mezcla en Polvo a Base de Cereales Instantáneos. *Publicaciones e Investigación*, 6, 123-129.
  117. LÓPEZ-VÁZQUEZ, M.; MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, J. S.; TALAVERA-ROJAS, M.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J. & VELÁZQUEZ-ORDÓÑEZ, V. (2015). Detección de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Archivos de medicina veterinaria*, 47(2), 245-249.
  118. LUO, D.; ZHAO, J. & RONG, J. (2016). Plant-derived triterpene celastrol ameliorates oxygen glucose deprivation-induced disruption of endothelial barrier assembly via inducing tight junction proteins. *Phytomedicine*, 23(13), 1621-1628.

119. MANJARREZ LÓPEZ, A. M.; DÍAZ ZARCO, S.; SALAZAR GARCÍA, F.; VALLADARES CARRANZA, B.; GUTIÉRREZ CASTILLO, A. D. C.; BARBABOSA PLLIEGO, A. & VELÁZQUEZ ORDOÑEZ, V. (2012). Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(2), 265-274.
120. MARTÍNEZ BENCARDINO, C. (2016). Estadística básica aplicada, 4ta Edición. Ecoe Ediciones. ISBN 978-958-648-766-5. CDD: 519.53 ED. 20 CO-BoBN- a798458. Disponible en internet:  
[http://xlibros.com/wp-content/uploads/2014/04/Estad%C3%ADstica-B%C3%A1sica-Aplicada-FL\\_redacted.pdf](http://xlibros.com/wp-content/uploads/2014/04/Estad%C3%ADstica-B%C3%A1sica-Aplicada-FL_redacted.pdf). Consultado 10 de marzo de 2017.
121. MARTÍNEZ PACHECO, D.; CRUZ CARRILLO, A. & MORENO, G. (2013). Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes. *Conexión Agropecuaria JDC*, 3(1), 53-73.
122. MARTÍNEZ, G. M.; SUÁREZ, V. H. & GHEZZI, M. D. (2016). Bienestar animal en bovinos de leche: selección de indicadores vinculados a la salud y producción. *RIA, Revista de investigaciones agropecuarias*, 42(2), 153-160.
123. MARTÍNEZ-PACHECO, D.; CRUZ-CARRILLO, A.; MILLÁN, A. & MORENO-FIGUEREDO, G. (2015). Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del Municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). *Revista Científica*, 25(3).
124. MATEU, E. & CASAL, J. (2003). Tamaño de la muestra. *Rev Epidem Med Prev*, 1, 8-14.
125. Mc DOUGALL, S.; HUSSEIN, H. & PETROVSKI, K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand veterinary journal*, 62(2), 68-76.
126. McDOUGALL, S.; ARTHUR, D. G.; BRYAN, M. A.; VERMUNT, J. J. & WEIR, A. M. (2007). Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *New Zealand veterinary journal*, 55(4), 161-170.
127. MENDONÇA, A. H.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; NICOLI, J. R.; SOUSA, S. M. M.; NARDI, R. M. D.; SOUZA, F. N. & ARANTES, R. M. E. (2014). A *Lactobacillus rhamnosus* strain induces protection in different sites after *Salmonella enterica* subsp.

- enterica serovar *Typhimurium* challenge in gnotobiotic and conventional mice. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 66(2), 347-354.
128. METCHNIKOFF, I. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. Heinemann, W. (Ed.) The prolongation of life: Optimistic studies. Butterworth-Heinemann, London, p. 161-183.
  129. MICHEA, M. A.; BRICEÑO, C.; ALCOTA, M. & GONZÁLEZ, F. E. (2016). Péptidos antimicrobianos y mediadores lipídicos: rol en las enfermedades periodontales. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 9(3), 231-237.
  130. MIYOSHI, N.; SAITO, T.; OHMURA, T.; KURODA, K.; SUITA, K.; IHARA, K. & ISOGAI, E. (2016). Functional structure and antimicrobial activity of persulcatusin, an antimicrobial peptide from the hard tick *Ixodes persulcatus*. Parasites & vectors, 9(1), 85.
  131. MOJICA, J. A. & JARAMILLO, D. A. (2014). Prevalencia de mastitis subclínica en sistemas de producción bovina doble propósito de la vereda Matepiña del municipio de Arauca, Colombia. Rev Sist Prod Agroecol. 5(2).
  132. MONDRAGÓN PRECIADO, G.; ESCALANTEMINAKATA, P.; OSUNA CASTRO, J. A.; IBARRA JUNQUERA, V.; MORLETT CHÁVEZ, J. A.; AGUILAR GONZÁLEZ, C. N. & RODRÍGUEZ HERRERA, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. Investigación y Ciencia, 21(59).
  133. MONTEAGUDO-MERA, A.; CARO, I.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; RÚA, J.; FERRERO, M. A. & GARCÍA-ARMESTO, M. R. (2011). Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. Journal of food protection, 74(8), 1379-1386.
  134. MORA, M. G.; VARGAS, B.; ROMERO, J. J. & CAMACHO, J. (2015). Factores de riesgo para la incidencia de mastitis clínica en ganado lechero de Costa Rica. Agronomía Costarricense, 39(2), 77-89.
  135. MOREIRA DA SILVA, F. J. M.; FERNANDES, C. M.; DE LIMA, D. C. N.; MADEIRA, R. O.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L. & RAMOS, A. M. (2013). Stability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* in minimally processed cabbage. International Journal of Postharvest Technology and Innovation, 3(2), 140-150.
  136. MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P. & CARLI, S. (2006). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. Journal of dairy science, 89(8), 2973-2976.

137. MOTTA, L. I.; BARBANO, P. M.; PÉREZ, R. A.; CAVANNA, F.; LAVARELLO HERBIN, A. & GARBACCIO, S. (2015). Calidad de leche en tambos familiares del periurbano oeste del área metropolitana de Buenos Aires. In V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata). Disponible en internet: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52498>. Consultado 03 de febrero de 2017.
138. NES, I. F.; DIEP D. B. & HOLO H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Bacteriol. 189, 1189–1198.
139. NICOLA, F. & CASELLAS, J. M. (2012). ¿Cómo predecir el éxito o fracaso del tratamiento antibiótico?: Qué es y para qué sirve la farmacocinética-farmacodinamia. La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana, 2(2). Disponible en internet: <http://www.sdird.org/pdf/gacetainfmicrobiolclinvol2n2.pdf#page=35>. Consultado: 03 de febrero de 2017.
140. NIKAWA, H. (2016). Bacteriocin derived from *Lactobacillus rhamnosus*. U.S. Patent No 9,314,498, 19 Abr. 2016.
141. NODA, M.; MIYAUCHI, R.; DANSHITSOODOL, N.; HIGASHIKAWA, F.; KUMAGAI, T.; MATOBA, Y. & SUGIYAMA, M. (2015). Characterization and mutational analysis of a two-polypeptide bacteriocin produced by citrus iyo-derived *Lactobacillus brevis* 174A. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 38(12), 1902-1909.
142. NUNES, S. F.; BEXIGA, R.; CAVACO, L. M. & VILELA, C. L. (2007). Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. Journal of dairy science, 90(7), 3242-3246.
143. OCHOA-ZARZOSA, A.; LOEZA-LARA, P. D.; TORRES-RODRÍGUEZ, F.; LOEZA-ÁNGELES, H.; MASCOT-CHIQUITO, N.; SÁNCHEZ-BACA, S. & LÓPEZ-MEZA, J. E. (2008). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie van Leeuwenhoek, 94(2), 199-206.
144. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en internet: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/antimicrobianos/>. Consultado: 10 de febrero de 2017.
145. OLEA, A.; DÍAZ, J.; FUENTES, R.; VAQUERO, A. & GARCÍA, M. (2012). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. Revista chilena de infectología, 29(5), 504-510.

146. OLISZEWSKI, R. (2016). Caracterización composicional, física-química y microbiológica de leche de vaca de la Cuenca de Trancas. *Revista Argentina de Producción Animal*, 36(1), 31-39.
147. OLIVEIRA, L. D. C.; SILVEIRA, A. M.; MONTEIRO, A. D. S.; DOS SANTOS, V. L.; NICOLI, J. R.; AZEVEDO, V. A. D. C. & NARDI, R. M. (2017). In silico Prediction, in vitro Antibacterial Spectrum, and Physicochemical Properties of a Putative Bacteriocin Produced by *Lactobacillus rhamnosus* Strain L156. 4. *Frontiers in microbiology*, 8.
148. OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C. & RUEGG, P. L. (2012). Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Journal of dairy science*, 95(4), 1913-1920.
149. OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H. H. & MOSELEY, W. M. (2004). Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 87(8), 2393-2400.
150. OLVERA-GARCÍA, M.; SERRANO, E. & QUIRASCO, M. (2015). Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas. *BioTecnología*, 19 (1).
151. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015). Enfermedades de transmisión alimentaria. Temas de salud. Disponible en internet:  
[http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/). Consultado: 06 de febrero de 2017.
152. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Disponible en internet:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Consultado: 10 de febrero de 2017.
153. ORANTES-ZEBADÚA, M. Á.; PLATAS-ROSADO, D.; CÓRDOVA-AVALOS, V.; LOS SANTOS-LARA, D.; DEL CARMEN, M. & CÓRDOVA-AVALOS, A. (2014). Caracterización de la ganadería de doble propósito en una región de Chiapas, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(1), 49-58.
154. ORTEGA, C.; SIMÓN, M. & ALONSO, J. (2017). Problemas Asociados a los Métodos de Valoración de la Resistencia a Antibióticos; El Caso de *Staphylococcus aureus*. *Revista Veterinaria Argentina*, 34(350), 1852-317X.
155. OVCHINNIKOV, K. V.; KRISTIENSEN, P. E.; STRAUME, D.; JENSEN, M. S.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; NES, I. F. & DIEP, D. B. (2017). The Leaderless

- Bacteriocin Enterocin K1 Is Highly Potent against *Enterococcus faecium*: A Study on Structure, Target Spectrum and Receptor. *Frontiers in microbiology*, 8.
156. PAL, G. & SRIVASTAVA, S. (2015). In vitro activity of a recombinant ABC transporter protein in the processing of plantaricin E pre-peptide. *Archives of microbiology*, 197(6), 843-849.
  157. PAPP, Z.; CLARK, R. G.; PARMLEY, E. J.; LEIGHTON, F. A., WALDNER, C. & SOOS, C. (2017). The ecology of avian influenza viruses in wild dabbling ducks (*Anas* spp.) in Canada. *PloS one*, 12(5), e0176297.
  158. PELLEGRINO, M. S.; FROLA, I. D.; ODIERNO, L. M. & BOGNI, C. I. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(7).
  159. PELLEGRINO, M.; FRIGERIO, C.; GIRAUDO, J.; BETTERA, S.; RASPANTI, C.; FERNANDEZ, I.; GHIONE, L. & BOGNI, C. (2006). Mastitis Bovina: Identificación de *Staphylococcus* aislados de leche en tambos del sur de la provincia de Córdoba. Congreso; XVI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; Mar del Plata. Disponible en internet: [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=39495&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=1079564](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=39495&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1079564). Consultado: 04 de febrero de 2017.
  160. PEÑA, J. & UFFO, O. (2010). Primer informe en cuba de variación genotípica e *Staphylococcus aureus* aislado de leche bovina. *Revista de Salud Animal*, 32(2), p. 124-127.
  161. PEÑA, J. & UFFO, O. 2013. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35(3), 189-196.
  162. PEREYRA, E.; DALLARD, B. & CALVINHO, L. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista argentina de microbiología*, 46(4), p. 363-375.
  163. PETROVA, M. I.; IMHOLZ, N. C.; VERHOEVEN, T. L.; BALZARINI, J.; VAN DAMME, E. J.; SCHOLS, D. & LEBEER, S. (2016). Lectin-Like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation. *PloS one*, 11(8), e0161337.
  164. PREMKUMAR, D. (2016). Determination of bacteriocidal activity of bacteriocin produced by a clinical isolate of *E. coli* against human pathogens. *International Journal of Current Research and Review*, 8(8), p. 4.

165. PROTEINS DAILY BLOG. (2014). Productos ecológicos. ISSN 1695-7504 2011. Disponible en internet:  
<https://proteinsdailyblog.wordpress.com/2014/01/08/productos-ecologicos-lo-mejor-de-lo-mejor/>. Consultado: 25 de febrero de 2017.
166. PYÖRÄLÄ, S. (2016). El Tratamiento de la Mastitis Durante la Lactancia. Boletín Electrónico 12, 01. Disponible en internet:  
<http://www.perulactea.com/2011/04/01/el-tratamiento-de-la-mastitis-durante-la-lactancia/>. Consultado: 03 de febrero de 2017.
167. RAMÍREZ VÁSQUEZ, N.; ARROYAVE HENAO, O.; CERÓN-MUÑOZ, M.; JARAMILLO, M.; CERÓN, J. & PALACIO, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. Revista de Medicina Veterinaria, (22), 31-42.
168. RAMÍREZ, N.; GAVIRIA, G.; ARROYAVE, O.; SIERRA, B. & BENJUMEA, J. (2016). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 14(1), 76-87.
169. RAMÍREZ-ROMERO, G.; REYES-VELAZQUEZ, M. & CRUZ-GUERRERO, A. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 12(3), 463-471.
170. RAMOS, A.; CSEH, S. & PAOLICCHI, F. (2013). Efecto de la suplementación con selenio sobre la presencia de mastitis en vacas lecheras. Revista Argentina de Producción Animal, 28(3), 217-225.
171. REDACCIÓN MÉDICA. (2015). España, líder mundial en resistencia a antibióticos. Disponible en internet:  
<https://www.redaccionmedica.com/noticia/espana-donde-menos-funcionan-los-antibioticos-88122>. Consultado: 20 de febrero de 2017.
172. REINOSO V. & SOTO C. (2015). Importancia de la vitamina E y el selenio en vacas lecheras. Entorno Ganadero. Disponible en internet:  
<http://bmeditores.mx/wp-content/uploads/2015/04/ganadero-71.pdf>. Consultado: 02 de febrero de 2017.
173. RENEAU, J. (1986). Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. Journal of dairy science, 69(6), 1708-1720.

174. REVELLI, G. R.; SBODIO, O. A. & TERCERO, E. J. (2011). Estudio y evolución de la calidad de leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina (1993-2009). *Revista de investigaciones agropecuarias*, 37(2), 128-139.
175. REYES, M. P. (2015). Principales vulnerabilidades en la mastitis bovina en una Empresa Pecuaria Oriental de Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(5), 1-9.
176. RÍOS, R. S.; RAMOS, N. A.; VRANIC, M. L. & FARÍAS, M. E. (2013). Desarrollo de un Sellador Post-Ordeño con Goma Espina Corona. *Información tecnológica*, 24(2), 31-36.
177. ROCES, C.; CAMPELO, A. B.; PÉREZ, V.; BLANCO, D.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, A. & MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, B. (2012). Mecanismos implicados en la resistencia de *Lactococcus lactis* a la bacteriocina Lcn972. 6ª reunión de la Red temática BAL (Participación de las Bacterias Lácticas en la Salud Humana y en la Calidad Alimentaria), Tarragona. Disponible en internet: <http://hdl.handle.net/10261/81534>. Consultado: 03 de marzo de 2017.
178. RODRIGUES DE OLIVEIRA, L.; GOMES ALVES, M. E.; ROBSON DUARTE, E. & FARIA DE OLIVEIRA, N. J. (2015). Controle biológico de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina. *Caderno de Ciências Agrárias*, 7(Suppl), 166-177.
179. RODRÍGUEZ, M. C.; RIVERA, C. P.; CIRIA, J. C.; NIEVES, M. R. & CRESPO, L. N. (2014). Prevalencia e incidencia de infecciones intramamarias en vacas de raza carora en sistemas de pastoreo y estabulación. *Revista Científica*, 24(1), 47-54.
180. RUEGG, P. L. (2012). Factores que influyen en el tratamiento de las mastitis clínicas. Producción animal. Ponencia presentada en el XVI Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. University of Wisconsin, Madison. Disponible en internet: <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/El-tratamiento-de-las-Mastitis-CI%C3%ADnicas-ANEMBE-2011.pdf>. Consultado: 10 de febrero de 2017.
181. RUIZ, A. K.; GONZÁLEZ, D. & PEÑA, J. (2012). Situación de la mastitis bovina en Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(12), 1-12.
182. RUIZ, A. K.; PONCE, P.; GOMES, G.; MOTA, R. A.; ELIZABETH, S.; LUCENA, E. R. & BENONE, S. (2011). Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 57-64.
183. RUIZ, J. D.; RAMÍREZ, N. & ARROYAVE, O. (2016). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de



- glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 143-154.
184. RUIZ-MOYANO, S.; SECO DE HERRERA, A.; HERNÁNDEZ, R.; CASQUETE PALENCIA, M. J.; SERRADILLA SÁNCHEZ, A. M.; GONZÁLEZ, M. J.; BENITO BERNÁLDEZ & CÓRDOBA RAMOS, M. G. (2012). Efecto de la aplicación de bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas en las propiedades sensoriales de embutidos crudos curados ibéricos. *Avances en microbiología de los alimentos. Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos, Universidad de La Rioja, España*. 265-266.
  185. RUSSI, N.; BANTAR, C. & CALVINHO, L. (2008). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), p. 116-119.
  186. SAHOO, T. K.; JENA, P. K.; PATEL, A. K. & SESHADRI, S. (2015). Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by *Lactobacillus animalis* TSU4. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(1), 90-104.
  187. SAINI, V.; RIEKERINK, R. O.; MCCLURE, J. T. & BARKEMA, H. W. (2011). Diagnostic Accuracy Assessment of Sensititre® and Agar Disk Diffusion for Determining Antimicrobial Resistance Profiles of Bovine Clinical Mastitis Pathogens. *Journal of clinical microbiology*. Disponible en internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122827/>. Consultado: 23 de febrero de 2017.
  188. SALAS, Z.; CALLE, E.; FALCÓN, T.; PINTO, J. & ESPINOZA, B. (2013). Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 252-254.
  189. SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M. A.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S. & BORIE, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2), 221-234.
  190. SÁNCHEZ, C.; SUERO, M.; CASTIGNANI, H.; TERÁN, J. & MARINO, M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011). Trabajo de investigación presentado en XLIII Reunión Anual de Economía Agraria. Corrientes, Argentina.

191. SÁNCHEZ, L. & TROMPS, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 124-129.
192. SÁNCHEZ, L.; OMURA, M.; LUCAS, A.; PÉREZ, T.; LLANES, M. & FERREIRA, C. D. L. (2015). Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 94-104.
193. SÁNCHEZ, M. L. (2016). Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. *Asociación Bioquímica Argentina; Bioquímica y Patología Clínica*; 80(1)36-43. Disponible en internet: <http://www.aba-online.org.ar/ejemplares-revista-bypc-2016/revista-vol-80-n-1-enero-abril>. Consultado: 15 de marzo de 2017.
194. SÁNCHEZ, M.; RUIZ, M. & MORALES, M. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(1), 45-59.
195. SANI (Vademecum veterinario). (2016). Disponible en internet: <http://www.sani.com.ar/>. Consultado: 15 de febrero de 2017.
196. SCHAEFFER, J.; BJÖRNSSON, Y.; BURCH, N.; KISHIMOTO, A.; LAKE, R.; LU, P. & SUTPHEN, S. (2005). Solving checkers. En *Proceedings of the 19th international joint conference on Artificial intelligence*. Morgan Kaufmann Publishers Inc., 292-297.
197. SCHANZENBACH, R. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* mxvk133 y *Enterococcus faecalis* mxvk22 aisladas de productos cárnicos mexicanos. Tesis doctoral, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
198. SCHILLINGER, U. & LÜCKE, F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4(3), 199-208.
199. SCHILLINGER, U.; KAYA, M. & LÜCKE, F. K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 473-478.
200. SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
201. SEIJA V. (2006). Genero *Staphylococcus*. Sección III Etiopatogenia microbiológica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 2º edición corregida. Departamento de

- Bacteriología y Virología Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 257-271.
202. SEMIOLOGÍA VETERINARIA, UBA, GUIA COMPLETA. (2014). Exploración clínica de la glándula mamaria en la vaca, 240-251. Disponible en internet: [www.fvet.uba.ar/areas/semiologia/semiologia\\_guia\\_completa.pdf](http://www.fvet.uba.ar/areas/semiologia/semiologia_guia_completa.pdf). Consultado: 15 de noviembre de 2016.
  203. SENASA/EDeSA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria /Ente Departamental de Salud Animal). (2012). 1° campaña de vacunación, período marzo-abril 2012.
  204. SHA, Y.; LIU, M.; WANG, B.; JIANG, K.; QI, C. & WANG, L. (2016). Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(10), 1736-1745.
  205. SICA, M. G. (2015). Bacterias lácticas del estuario de Bahía Blanca: evaluación de sus propiedades probióticas para su potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral en Bioquímica de Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
  206. SONG, J. W.; YANG, S. J.; SHIN, S.; SEO, K. S.; PARK, Y. H. & PARK, K. T. (2016). Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1725-1732.
  207. STARR, C.; HE, J. & WIMLEY, W. (2017). Discovering Novel Antimicrobial Peptides using High-Throughput Screening in the Presence of Human Erythrocytes. *Biophysical Journal*, 112(3), 382a.
  208. SUÁREZ RODRÍGUEZ, M. & SOLÍS SÁNCHEZ, G. (2015). Empleo de probióticos en la prevención de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros. *Nutrición Hospitalaria*, 3(01), 68-71.
  209. SUAREZ, V. H.; MARTINEZ, G. M.; GIANRE, V.; CALVINHO, L.; RACHOSKI, A.; CHAVEZ, M. & BERTONI, E. (2014). Relaciones entre el recuento de células somáticas, test de mastitis California, conductividad eléctrica y el diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 40(2), 145-153.
  210. SWAIN, M. R.; ANANDHARAJ, M.; RAY, R. C. & PARVEEN RANI, R. (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology research international*, 2014 (ID 250424), 19.

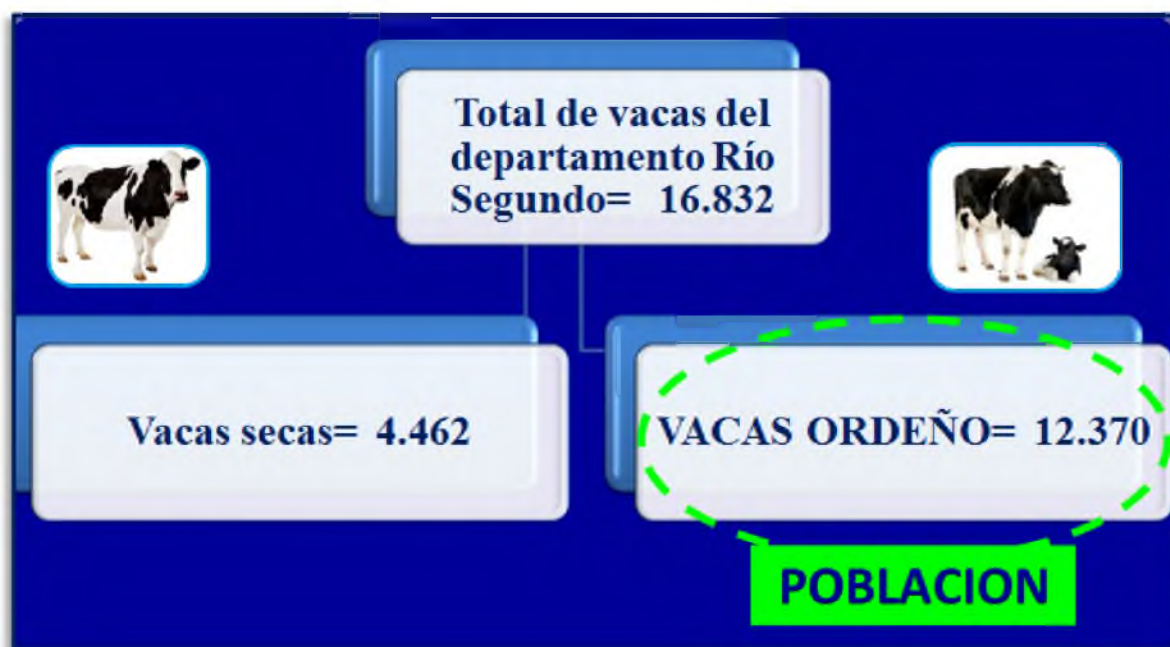
211. SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; FRANKOWSKA, A.; KOT, B. & ZALEWSKA, M. (2014). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(3), 355-362.
212. TAMARIZ, J. H.; LEZAMETA, L. & GUERRA, H. (2014). Phagothrapy faced with *Staphylococcus aureus* methicilin resistant infections in mice. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(1), 69-77.
213. TÉLLEZ, G. A. & CASTAÑO, J. C. (2010). Antimicrobial peptides. *Infectio*, 14(1), 55-67.
214. THOMAS, V.; DE JONG, A.; MOYAERT, H.; SIMJEE, S.; EL GARCH, F.; MORRISSEY, I. & VALLÉ, M. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *International journal of antimicrobial agents*, 46(1), 13-20.
215. TISSIER, H. (1907). Traitement des infections intestinales par la methode de la flore bacterienne de l'intestin. *CR Soc Biol*, 60, 359-361.
216. TONARELLI, G. & SIMONETTA, A. (2014). Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *FABICIB*, 17, 137-177.
217. TRAMER, J. & FOWLER, G. G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(8), 522-528.
218. TRIVEDI, D.; JENA, P. & SESHADRI, S. (2014). Colicin E2 Expression in *Lactobacillus brevis* DT24, a vaginal probiotic isolate, against uropathogenic *Escherichia coli*. Hindawi Publishing Corporation, ISRN urology, 2014.
219. TYTGAT, H. L.; DOUILLARD, F. P.; REUNANEN, J.; RASINKANGAS, P.; HENDRICKX, A. P.; LAINE, P. K. & DE VOS, W. M. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG outcompetes *Enterococcus faecium* via mucus-binding pili: evidence for a novel and heterospecific probiotic mechanism. *Applied and environmental microbiology*, 82(19), 5756-5762.
220. USDA, United States Department of Agriculture. (2016). Argentina - Dairy and Products Semi-anual. Disponible en internet:

- [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Semi-annual\\_Buenos%20Aires\\_Argentina\\_5-11-2016.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Semi-annual_Buenos%20Aires_Argentina_5-11-2016.pdf). Consultado: 10 de diciembre de 2017.
221. VALERO-LEAL, K.; RIVERA-SALAZAR, J.; VALBUENA, E.; BOSCAN, L.; VALERIS, R.; CASTRO, G. & BRINEZ, W. (2012). Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. Revista Científica, 22(004), 303-314.
  222. VASILCHENKO, A.; ROGOZHIN, E. & VALYSHEV, A. (2016). Purification of a Novel Bacteriocin-Like Inhibitory Substance produced by *Enterococcus faecium* ICIS 8 and Characterization of Its Mode of Action. Microbial Drug Resistance.
  223. VEGLIA, E.; PINI, A.; MOGGIO, A.; GRANGE, C.; PREMOSSELLI, F.; MIGLIO, G. & ROSA, A. C. (2016). Histamine type 1-receptor activation by low dose of histamine undermines human glomerular slit diaphragm integrity. Pharmacological research, 114, 27-38.
  224. VEVPA (Vademecum veterinario). (2016). Disponible en internet: <http://www.vevpa.com.ar/>. Consultado: 15 de febrero de 2017.
  225. VICH (Veterinary International Conference on Harmonisation). (1998). Topic GL2: Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. European Medicines Agency, London. Disponible en internet: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC50004340.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC50004340.pdf). Consultado: 15 de marzo de 2017.
  226. VIMONT, A.; FERNANDEZ, B.; HAMMAMI, R.; ABABSA, A.; DABA, H. & FLISS, I. (2017). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. Frontiers in microbiology, 8.
  227. VISSIO, C.; AGÜERO, D. A.; RASPANTI, C. G.; ODIERNO, L. M. & LARRIESTRA, A. J. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. Archivos de medicina veterinaria, 47(1), 7-14.
  228. VISSIO, C.; DIESER, S. A.; RASPANTI, C. G.; GIRAUDO, J. A.; BOGNI, C. I.; ODIERNO, L. M. & LARRIESTRA, A. J. (2013). Dairy herd mastitis program in Argentina: farm clusters and effects on bulk milk somatic cell counts. Pak Vet J, 33, 80-84.

229. WANG, W. L.; LIU, J.; HUO, Y. B. & LING, J. Q. (2013). Bacteriocin immunity proteins play a role in quorum-sensing system regulated antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* UA159. *Archives of oral biology*, 58(4), 384-390.
230. WILEY & SONS (2013). Probióticos para la prevención de la diarrea asociada al *Clostridium difficile* en adultos y niños (Revisión Cochrane traducida). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013 Issue 5. Art. No.: CD006095. DOI: 10.1002/14651858.CD006095. Usado con permiso de John Wiley & Sons, Ltd. © John Wiley & Sons, Ltd.
231. YANG, R.; JOHNSON, M. C. & RAY, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3355-3359.
232. YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M. & KOJIMA, A. (2002). Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(9), 457-460.
233. ZAMORA-RODRÍGUEZ, L. M. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química agraria y Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona, España.
234. ZAPATA, S.; MUNOZ, J.; RUIZ, O. S., MONTROYA, O. I. & GUTIERREZ, P. A. (2009). Isolation of *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and partial characterization of its bacteriocin. *Vitae*, 16(1), 75-82.
235. ZHANG, Q.; YANG, M.; QU, Z.; ZHOU, J. & JIANG, Q. (2016). Autophagy prevention sensitizes AKTi-1/2-induced anti-hepatocellular carcinoma cell activity in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 480(3), 334-340.
236. ZIV, G. (1980). Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(10) Spec No, 1109-1115.
237. ZSCHÖCK, M.; EL-SAYED, A.; EISSA, N.; LÄMMLER, C. & VAZQUEZ, H. C. (2011). Penicillin G and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinaria México OA*, 42(3).

## CAPÍTULO VIII. ANEXOS

**VIII.1. Selección de la población objeto de análisis para la estimación de mastitis bovina en el departamento Río Segundo, Córdoba (SENASA / EDeSA, 2012)**



**VIII.2. Localidades del departamento Río Segundo desde donde se obtuvieron las muestras de leche**

Localidad	Tambos	Vacas en ordeño	n muestreado
VILLA DEL ROSARIO	1	164	8
	2	132	7
	3	79	4
	4	81	4
SANTIAGO TEMPLE	5	406	20
	6	158	8
	7	122	6

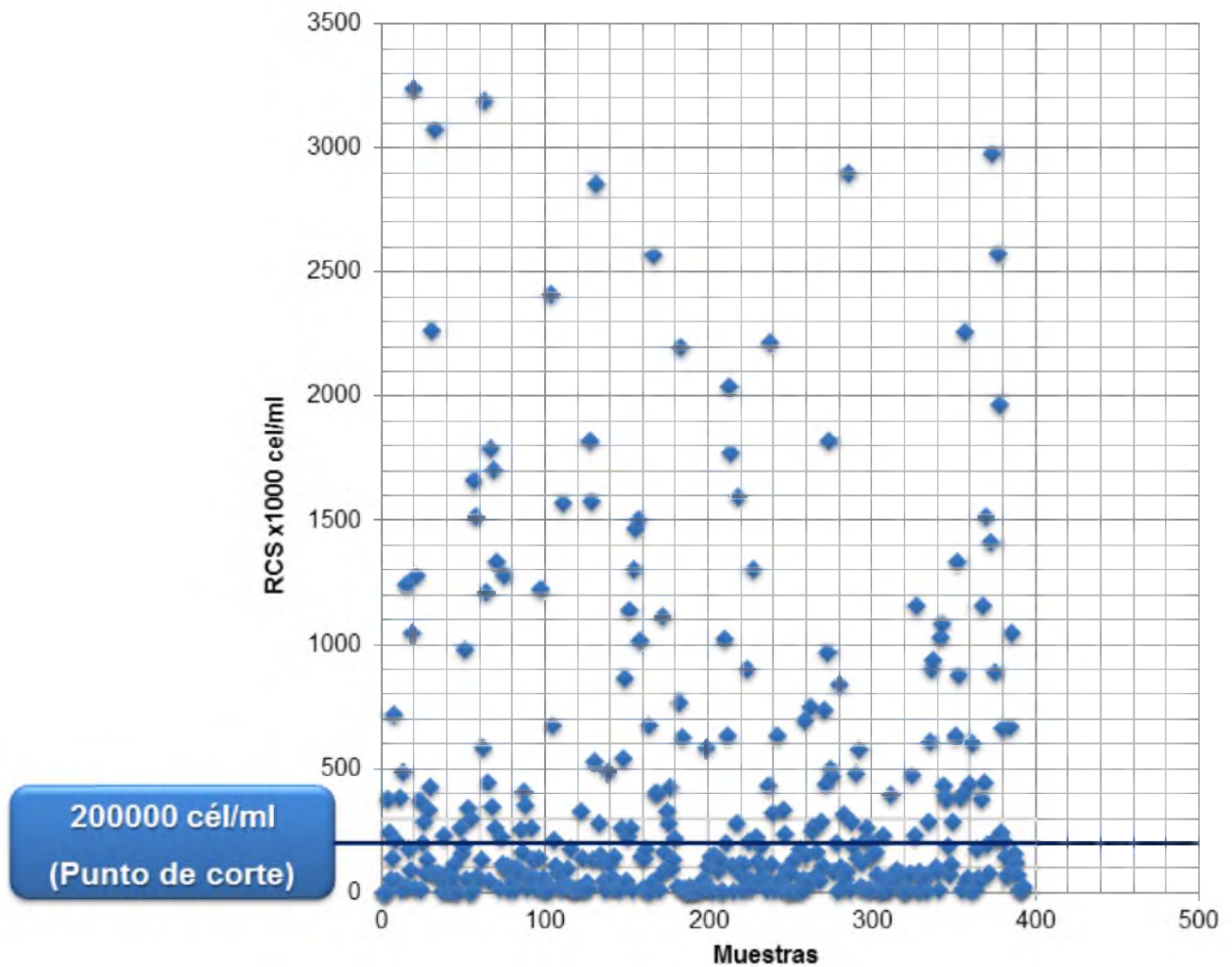
<b>LOS CHAÑARITOS</b>	8	163	8
	9	223	11
	10	198	10
	11	192	9
<b>COSTA SACATE</b>	12	119	6
<b>CAPILLA DEL CARMEN</b>	13	244	12
	14	205	10
<b>CALCHIN ESTACION</b>	15	437	22
	16	345	17
	17	284	14
	18	338	17
	19	158	8
	20	166	8
	21	248	12
	22	307	15
	23	178	9
	24	115	6
<b>LUQUE</b>	25	206	10
	26	147	7
	27	200	10
<b>CARRILOBO</b>	28	423	21
	29	338	17
	30	405	20
	31	145	7
	32	122	6
	33	127	6
<b>MANFREDI</b>	34	138	7
<b>CALCHIN OESTE</b>	35	206	10
	36	166	8
<b>LAS JUNTURAS</b>	37	102	5
<b>COLAZO</b>	38	97	5
		<b>TOTAL 2.269</b>	<b>TOTAL 112</b>



**VIII.3. ANOVA para la producción láctea (l/día/animal). Diferencias entre las categorías de tambos valorados mediante Test de Tukey ( $p < 0,05$ )**

Categorías	Media de producción láctea (l/día/animal)	D.E.	
Precario	14,7	2,0	A
Regular	17,3	1,4	B
Bueno	23,0	1,6	C
Muy bueno	29,1	2,4	D

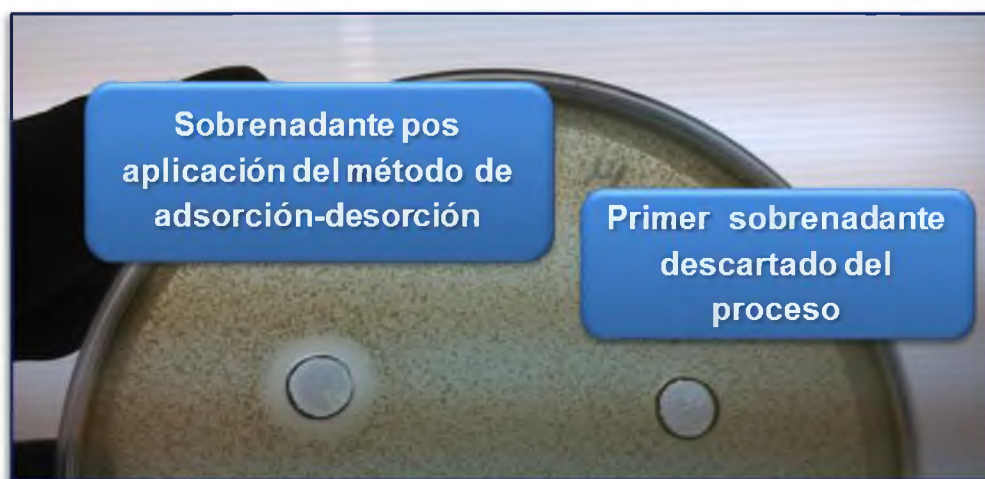
**VIII.4. Recuento de las células somáticas de las muestras de leche**



**VIII.5. Medida de los halos de los extractos libres de células de bacterias ácido lácticas, neutralizados y sin neutralizar**

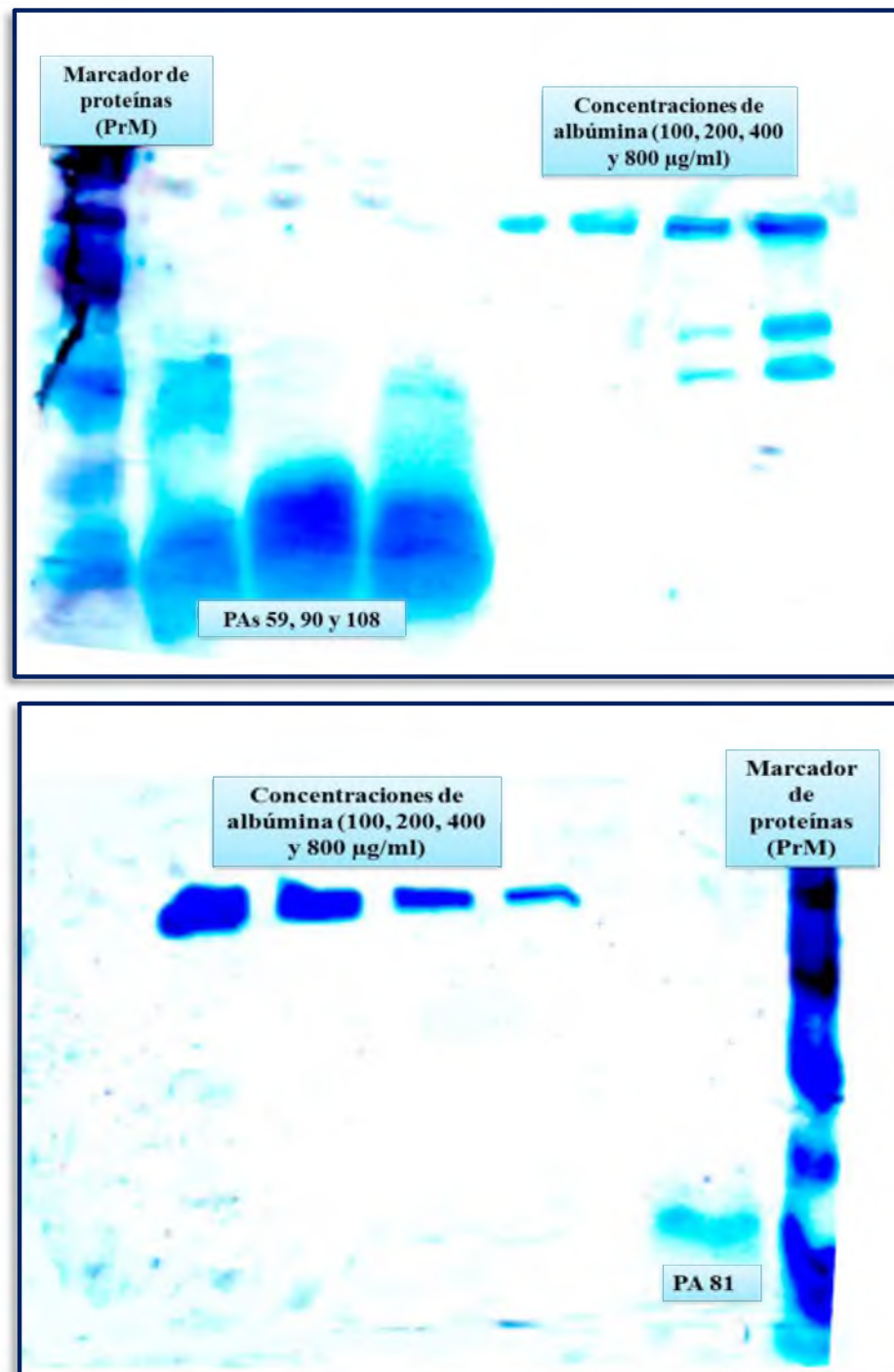
<b>Aislamientos de BAL</b>	<b>ELCSN (mm)</b>	<b>ELCN (mm)</b>
<b>1</b>	3,99	3,68
<b>4</b>	4,58	3,71
<b>7</b>	4,11	3,36
<b>11</b>	3,68	3,12
<b>12</b>	3,42	3,26
<b>15</b>	3,07	2,81
<b>59</b>	4,23	3,75
<b>81</b>	4,68	3,76
<b>88</b>	2,96	2,74
<b>90</b>	4,46	3,35
<b>108</b>	4,07	3,13
<b>117</b>	3,03	2,75
<b>325</b>	3,38	2,83

**VIII.6. Prueba de inhibición del crecimiento antimicrobiano de los sobrenadantes resultados de la aplicación del método de adsorción-desorción y de los primeros sobrenadantes descartados del proceso**



### VIII.7. Geles de las electroforesis utilizados para el cálculo de la concentración proteica de los péptidos antimicrobianos a través del programa ImageJ

Las siguientes imágenes con formato TIFF corresponden a los geles de las electroforesis necesarias para el cálculo de la concentración proteica de las bandas de los PAs en estudio a través del programa ImageJ.



### VIII.8. Resultado de las alineaciones de los péptidos antimicrobianos con péptidos reportados en la base de datos del National Center for Biotechnology Information

A continuación se observan las secuencias de cada uno de los PAs obtenidos en este trabajo, los péptidos con que han sido alineados y los resultados arrojados por la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). “Query cover” indica el porcentaje de cobertura por parte del péptido en estudio que cubre el alineamiento; “E value” representa el valor de significancia del resultado (mientras más cercano a 0, más significativo. E value  $\leq 0,02$ , secuencias probablemente homologas;  $0,02 < \text{E value} \leq 1$ , no se puede descartar homología; E value  $> 1$ , azar; <https://www.youtube.com/watch?v=-BQssCIeXJ8>); e “Ident” hace referencia al porcentaje de identidad (igual o superior a 45 % es indicativo de similar estructura y probable similar función).

Secuencia del péptido 59: TTHVAmVAGAIALGYVTAQMITNVDKSK

>BAU19437.1 *brevicin* 174A immunity protein [*Lactobacillus brevis*]

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download Graphics Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
unnamed protein product	20.6	33.5	35%	0.001	100%	Query_211933

Alignments

Download Graphics E value

unnamed protein product  
Sequence ID: Query\_211933 Length: 165 Number of Matches: 2

Range 1: 35 to 39 Graphics

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
20.6 bits(41)	0.001	5/5(100%)	5/5(100%)	0/5(0%)

Query 20 NITNV 24  
NITNV  
Sbjct 35 NITNV 39

Range 2: 71 to 75 Graphics

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
12.9 bits(23)	0.46	4/5(80%)	4/5(80%)	0/5(0%)

Query 14 GYVTA 18  
GY TA  
Sbjct 71 GYSTA 75

Secuencia del péptido 81: AVPAVRKTNET

>P86526.1 RecName: Full=Bacteriocin rhamnosin A [*Lactobacillus rhamnosus*]

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 1

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RecName: Full=Bacteriocin rhamnosin A [Lactobacillus rhamnosus]	36.7	36.7	100%	0.016	100%	P86526.1

RecName: Full=Bacteriocin rhamnosin A, partial [Lactobacillus rhamnosus]  
 Sequence ID: [P86526.1](#) Length: 13 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 11 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.7 bits(79)	0.016	11/11(100%)	11/11(100%)	0/11(0%)

Query 1 AVPAVRKTKET 11  
 AVPAVRKTKET  
 Subject 1 AVPAVRKTKET 11

[Related Information](#)

Secuencia del péptido 90: NPQTGEEIEIPASK

>WP\_053001772.1 *bacteriocin-associated protein* [*Enterococcus faecium*]

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [Graphics](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">unnamed protein product</a>	22.3	22.3	57%	3e-04	88%	Query_55933

[Alignments](#)

[Download](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

unnamed protein product  
 Sequence ID: Query\_55933 Length: 678 Number of Matches: 1

Range 1: 554 to 560 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(45)	3e-04	7/8(88%)	7/8(87%)	1/8(12%)

Query 1 NPQTGEEI 8  
 NPQT EEI  
 Subject 554 NPQT EEI 560

[Related Information](#)

Secuencia del péptido 108: RRDEISDLQR RDEISDLQR

>WP\_052256073.1 *bacteriocin cleavage/export ABC transporter* [*Lactobacillus brevis*]

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [Graphics](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">unnamed protein product</a>	20.6	54.3	84%	0.002	58%	Query_31913

unnamed protein product  
 Sequence ID: Query\_31913 Length: 617 Number of Matches: 4

Range 1: 440 to 449 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
20.6 bits(41)	0.002	7/12(58%)	9/12(75%)	2/12(16%)

Query 3 DEISDLQDEI 14  
 +EI +LQ DEI  
 Subject 440 DEIINLQ--DEI 449

Range 2: 440 to 449 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
15.1 bits(28)	0.20	4/7(57%)	6/7(85%)	0/7(0%)

Query 12 DEISDLQ 18  
 +EI +LQ  
 Subject 440 DEIINLQ 446

Range 3: 190 to 191 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
9.5 bits(15)	14	2/2(100%)	2/2(100%)	0/2(0%)

Query 17 LQ 18  
 LQ  
 Subject 190 LQ 191

Range 4: 209 to 210 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
9.1 bits(14)	20	2/2(100%)	2/2(100%)	0/2(0%)

Query 14 IS 15  
 IS  
 Subject 209 IS 210

[Related Information](#)



### VIII.9. Identificaciones genotípicas de las bacterias ácido lácticas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information

A continuación se observan las secuencias de los genes 16S ARNr de cada una de las bacterias ácido lácticas (81, 59, 90 y 108) y los resultados arrojados por la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además se pueden observar los alineamientos hechos por BLAST de nuestra secuencia pregunta (query) y la secuencia encontrada (subject). Estos alineamientos se presentan en un formato convencional de alineamiento pareado, mostrando además el porcentaje de identidad, el valor E del alineamiento, el número de gaps y el Score.

>59\_16S

```
TGCAGTCAACGAGCTTCCGCATGAATGACGTGCTTGCCTGATTTTAACAATGAAGC
GAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACA
CTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAA
AGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAG
GTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTC
GTAAAACTCTGTTGTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACG
GTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGA
AAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA
GTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTAC
```

Sequences producing significant alignments:						
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected: 1						
<a href="#">Alignments</a> <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus brevis strain Lb13H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1711	1711	100%	0.0	99% <a href="#">KP793173.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus brevis strain Lb2H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1711	1711	100%	0.0	99% <a href="#">KP793167.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus brevis strain TMW 1.2113, complete genome</a>	1707	8526	100%	0.0	99% <a href="#">CP019730.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lactobacillus brevis strain TMW 1.2111, complete genome</a>	1707	8509	100%	0.0	99% <a href="#">CP019743.1</a>

*Lactobacillus brevis* strain Lb13H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KP793173.1 Length: 1457 Number of Matches: 1

### Related Information

Range 1: 1 to 939 GenBank Graphics Next Match Previous Match

### Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1711 bits(926)	0.0	936/940(99%)	3/940(0%)	Plus/Plus

Query	1	TGCAGTC-AACGAGCTTCCGCATGAATGACGTGCTTGCACTGATTTTAACAATGAAGCGA	59
-------	---	--	----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	1	TGCAGTCGAACGAGCTTCCG-TTGAATGACGTGCTTGCACTGATTTTAACAATGAAGCGA	59
-------	---	--	----

Query	60	GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGA	119
-------	----	--	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	60	GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGA	119
-------	----	--	-----

Query	120	AACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTTGAAAGGTGGCTT	179
-------	-----	---	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	120	AACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTTGAAAGGTGGCTT	179
-------	-----	---	-----

Query	180	CGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCAC	239
-------	-----	---	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	180	CGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCAC	239
-------	-----	---	-----

Query	240	CAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	299
-------	-----	--	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	240	CAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	299
-------	-----	--	-----

Query	300	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG	359
-------	-----	--	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	300	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG	359
-------	-----	--	-----

Query	360	GAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA	419
-------	-----	---	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	360	GAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA	419
-------	-----	---	-----

Query	420	ACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC	479
-------	-----	--	-----

||||| ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct	420	ACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC	479
-------	-----	--	-----

```

Query  480  TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGT  539
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  480  TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGT  539

Query  540  AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAG  599
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  540  AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAG  599

Query  600  TGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGG  659
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  600  TGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGG  659

Query  660  TGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAC  719
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  660  TGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAC  719

Query  720  GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC  779
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  720  GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC  779

Query  780  GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT  839
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  780  GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT  839

Query  840  TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC-GGGGC  898
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  840  TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  899

Query  899  CCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTAC  938
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  900  CCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTAC  939

```

>81\_16S

```

TGCAGTCGAGCAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGGATAACACC
TGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAG
ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGT
AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA

```



ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGT  
 AAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGT  
 ATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
 GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTC  
 TGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGA  
 GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG  
 AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAA  
 AGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAAT  
 GCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCC  
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAC  
 AAGCGGTGGAACATGTGGTTTAATTTGAAGCTACCCGAAAAACCTTACCCAGGTCT  
 TGACATACTATGCAAAATCTTAAAAATTAAACGTTTCCCTTTCGGGGACATTGGATA  
 CCGGGGGGCAGGGGTTGTC

Sequences producing significant alignments:						
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected: 1						
<a href="#">Alignments</a> <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus rhamnosus strain BFE5264, complete genome</a>	1351	6727	91%	0.0	92%	<a href="#">CP014201.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus rhamnosus strain a74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1351	1351	91%	0.0	92%	<a href="#">KX057555.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus rhamnosus strain CMGB-L10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1349	1349	93%	0.0	92%	<a href="#">MF348222.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus rhamnosus strain a74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1346	1346	93%	0.0	92%	<a href="#">KX057555.1</a>

*Lactobacillus rhamnosus* strain BFE5264, complete genome

Sequence ID: CP014201.1 Length: 3068152 Number of Matches: 5

Related Information

Range 1: 1706554 to 1707499 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1351 bits(731)	0.0	878/950(92%)	6/950(0%)	Plus/Minus
Query 20	TATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA			79
Sbjct 1707499	TATTGAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA			1707440
Query 80	CGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA			139
Sbjct 1707439	CGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA			1707380



Sbjct 1706781 ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGG 1706722

Query 798 TGTGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGA 857  
 |||

Sbjct 1706721 TGTGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGA 1706662

Query 858 GTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAACA 917  
 |||||

Sbjct 1706661 GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGAGCA 1706602

Query 918 TGTGGTTTAATTTCTGAAGCTACCCGAAAAACCTTACCCAGGTCTTGACAT 967  
 |||

Sbjct 1706601 TGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC-AGGTCTTGACAT 1706554

>90\_16S

TGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGG  
 CGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAA  
 ACAGGTGCTAATAACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCT  
 TTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG  
 CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGAC  
 TGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA  
 CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAC  
 TCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTA  
 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA  
 GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATG  
 TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCA  
 GAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG  
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA  
 GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA

Sequences producing significant alignments:						
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected: 1						
<a href="#">Alignments</a> <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Enterococcus faecium strain CAU.296 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1506	1506	100%	0.0	100% <a href="#">MF369869.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Enterococcus faecium strain CAU.295 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1506	1506	100%	0.0	100% <a href="#">MF369868.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Enterococcus faecium strain CAU.202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1506	1506	100%	0.0	100% <a href="#">MF369860.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Enterococcus faecium strain CAU.197 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1506	1506	100%	0.0	100% <a href="#">MF369856.1</a>

*Enterococcus faecium* strain CAU: 296 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MF369869.1 Length: 1460 Number of Matches: 1

### Related Information

Range 1: 19 to 833 GenBank Graphics Next Match Previous Match

### Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1506 bits(815)	0.0	815/815(100%)	0/815(0%)	Plus/Plus

Query	1	TGCAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGA	60
Sbjct	19	TGCAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGA	78
Query	61	ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGT	120
Sbjct	79	ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGT	138
Query	121	GCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTGTATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGT	180
Sbjct	139	GCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTGTATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGT	198
Query	181	CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCC	240
Sbjct	199	CGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCC	258
Query	241	ACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA	300
Sbjct	259	ACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA	318
Query	301	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC	360
Sbjct	319	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC	378
Query	361	GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA	420
Sbjct	379	GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA	438
Query	421	TGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC	480

Sbjct 439 TGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 498

Query 481 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGCGA 540  
 |||

Sbjct 499 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGCGA 558

Query 541 GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG 600  
 |||

Sbjct 559 GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG 618

Query 601 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG 660  
 |||

Sbjct 619 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG 678

Query 661 CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG 720  
 |||

Sbjct 679 CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG 738

Query 721 AGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG 780  
 |||

Sbjct 739 AGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG 798

Query 781 ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA 815  
 |||

Sbjct 799 ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA 833

>108\_16S

GCTATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATT  
 GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCTTCGGCTTAAC  
 CGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTC  
 CATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC  
 TGTCTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC  
 TTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
 CGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATNTTAGAGATA  
 AGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC

Query 184 GGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAGT 243

Sbjct	468	GGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAC TG	527
Query	244	ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCG	303
Sbjct	528	ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCG	587
Query	304	TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT	363
Sbjct	588	TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT	647
Query	364	AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	423
Sbjct	648	AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	707
Query	424	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT	483
Sbjct	708	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT	767
Query	484	TGACATCTTCTGCCAATNTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGG	543
Sbjct	768	TGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGG	827
Query	544	TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA	603
Sbjct	828	TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA	887
Query	604	CCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAAC	663
Sbjct	888	CCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAAC	947
Query	664	CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT	723
Sbjct	948	CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT	1007
Query	724	GCTACAATGGACGGTACAACGAGTTGCGAAGTCGNGAGGNTAAGCTAATCTCTTAAAGCC	783
Sbjct	1008	GCTACAATGGACGGTACAACGAGTTGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCC	1067
Query	784	GTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC	843
Sbjct	1068	GTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATC	1127

```

Query 844  GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC 903
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1128  GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC 1187

Query 904  ATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGG 930
          ||||||||||||||||||||
Sbjct 1188  ATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGG 1214

```

**VIII.10. Diluciones de ATMs y péptidos antimicrobianos empleadas para las determinaciones de las concentraciones inhibitorias mínimas**

Diluciones en µg/ml				
ATMs	Péptido 59	Péptido 81	Péptido 90	Péptido 108
0,008				
0,015		0,016		
0,03	0,040	0,032		
0,06	0,081	0,064	0,060	0,056
0,12	0,162	0,128	0,121	0,113
0,25	0,323	0,256	0,241	0,226
0,5	0,647	0,513	0,483	0,452
1	1,294	1,025	0,966	0,903
2	2,588	2,050	1,931	1,806
4	5,175	4,100	3,863	3,613
8	10,350		7,725	7,225
16	20,700		15,450	14,450
32			30,900	28,900



**VIII.11. Cepas inhibidas de *S. aureus* a distintas diluciones de los péptidos antimicrobianos**

<b>Péptido 59</b>	<b>Cepas inhibidas</b>			
( $\mu\text{g/ml}$ )	F.A.	TOTAL	F.R. (%)	F.R.A. (%)
<b>0,04</b>	4	46	8,70	8,7
<b>0,081</b>	2	46	4,35	13,05
<b>0,162</b>	2	46	4,35	17,40
<b>0,323</b>	6	46	13,04	30,44
<b>0,647</b>	1	46	2,17	32,61
<b>1,294</b>	2	46	4,35	36,96
<b>2,588</b>	1	46	2,17	39,13
<b>5,175</b>	2	46	4,35	43,48
<b>10,35</b>		46	0,00	43,48
<b>20,7</b>		46	0,00	43,48
<b>Sin inhib</b>	26	46	56,52	100,00
<b>Total</b>	46		100	

F.A. frecuencia absoluta, F.R. frecuencia relativa, F.R.A. frecuencia relativa acumulada.

<b>Péptido 81</b>	<b>Cepas inhibidas</b>			
( $\mu\text{g/ml}$ )	F.A.	TOTAL	F.R. (%)	F.R.A. (%)
<b>0,016</b>		46	0,00	0,00
<b>0,032</b>		46	0,00	0,00
<b>0,064</b>	5	46	10,87	10,87
<b>0,128</b>	2	46	4,35	15,22
<b>0,256</b>		46	0,00	15,22
<b>0,513</b>		46	0,00	15,22
<b>1,025</b>	4	46	8,70	23,91
<b>2,05</b>	5	46	10,87	34,78
<b>4,1</b>	1	46	2,17	36,96
<b>sin inhib</b>	29	46	63,04	100,00
<b>Total</b>	46		100,00	

F.A. frecuencia absoluta, F.R. frecuencia relativa, F.R.A. frecuencia relativa acumulada.

<b>Péptido 90</b>	<b>Cepas inhibidas</b>			
( $\mu\text{g/ml}$ )	F.A.	TOTAL	F.R. (%)	F.R.A. (%)
<b>0,06</b>	8	46	17,39	17,39
<b>0,121</b>	2	46	4,35	21,74
<b>0,241</b>	2	46	4,35	26,09
<b>0,483</b>		46	0,00	26,09
<b>0,966</b>	3	46	6,52	32,61
<b>1,931</b>	3	46	6,52	39,13
<b>3,863</b>	1	46	2,17	41,30
<b>7,725</b>		46	0,00	41,30
<b>15,45</b>		46	0,00	41,30
<b>30,9</b>		46	0,00	41,30
<b>Sin inhib</b>	27	46	58,70	100,00
<b>Total</b>	46		100	

F.A. frecuencia absoluta, F.R. frecuencia relativa, F.R.A. frecuencia relativa acumulada.

<b>Péptido 108</b>	<b>Cepas inhibidas</b>			
( $\mu\text{g/ml}$ )	F.A.	TOTAL	F.R. (%)	F.R.A. (%)
<b>0,056</b>	7	46	15,22	15,22
<b>0,113</b>	1	46	2,17	17,39
<b>0,226</b>	1	46	2,17	19,57
<b>0,452</b>	3	46	6,52	26,09
<b>0,903</b>	1	46	2,17	28,26
<b>1,806</b>		46	0,00	28,26
<b>3,613</b>	5	46	10,87	39,13
<b>7,225</b>		46	0,00	39,13
<b>14,45</b>		46	0,00	39,13
<b>28,9</b>		46	0,00	39,13
<b>Sin inhib</b>	28	46	60,87	100,00
<b>Total</b>	46		100	

F.A. frecuencia absoluta, F.R. frecuencia relativa, F.R.A. frecuencia relativa acumulada.

**VIII.12. Frecuencias relativas acumuladas de las cepas inhibidas ante los ATMs y los péptidos antimicrobianos a las distintas diluciones.**

Dilución		Cepas inhibidas (%) - FRA %								
(µg/ml)	Oxi	CLX	GEN	TIL	AMP	PEN	PA 59	PA 81	PA 90	PA 108
<b>0,008</b>	0	0	0	0	19,57	0				
<b>0,015</b>	0	19,57	0	58,7	43,48	19,57		0		
<b>0,03</b>	10,87	39,13	36,96	73,91	56,52	28,26	8,7	0		
<b>0,06</b>	15,22	47,83	41,3	78,26	60,87	47,83	13,05	10,87	17,39	15,22
<b>0,12</b>	50	60,87	45,65	82,61	63,04	54,35	17,4	15,22	21,74	17,39
<b>0,25</b>	67,39	73,91	50	86,96	67,39	67,39	30,44	15,22	26,09	19,57
<b>0,5</b>	95,65	84,78	71,74	86,96	80,43	71,74	32,61	15,22	26,09	26,09
<b>1</b>	97,83	95,65	86,96	91,3	86,96	78,26	36,96	23,91	32,61	28,26
<b>2</b>	100	97,83	95,65	95,65	91,3	84,78	39,13	34,78	39,13	28,26
<b>4</b>	100	97,83	100	100	93,48	91,3	43,48	36,96	41,3	39,13
<b>8</b>	100	100	100	100	100	95,65	43,48		41,3	39,13
<b>16</b>	100	100	100	100	100	95,65	43,48		41,3	39,13
<b>32</b>	100	100	100	100	100	95,65			41,3	39,13
<b>Sin inhibición</b>						4,35	56,52	63,04	58,7	60,87

OXI: oxitetraciclina, CLX: cloxacilina, GEN: gentamicina, TIL: tilosina, AMP: ampicilina, PEN: bencilpenicilina; PA: péptido antimicrobiano.